



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/705, C12N 5/10	A1	(11) 国際公開番号 WO95/35371 (43) 国際公開日 1995年12月28日(28.12.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01206 (22) 国際出願日 1995年6月16日(16.06.95) (30) 優先権データ 特願平6/136100 1994年6月17日(17.06.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社(KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (71) 出願人 (米国について) 吉川邦子(YOSHIKAWA, Kuniko)[JP/JP] (吉川正明(死亡)の相続人) 〒001 北海道札幌市北区北24条西12丁目 1-7-A-9 Hokkaido, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 柿谷 誠(KAKITANI, Makoto)[JP/JP] 梅基直行(UMEMOTO, Naoyuki)[JP/JP] 石田 功(ISHIDA, Isao)[JP/JP] 岩松明彦(IWAMATSU, Akihiro)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 キリンビール株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP)		(72) 発明者 吉川正明(YOSHIKAWA, Masaaki) (死亡)相続人 (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 虎ノ門中田ビル2F Tokyo, (JP) (81) 指定国 AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ, UG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : GLUCAN ELICITOR RECEPTOR AND DNA CODING FOR THE SAME (54) 発明の名称 グルカンエリシターレセプターおよびそれをコードするDNA (57) Abstract <p>A glucan elicitor receptor having substantially the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing; a DNA or a fragment thereof containing a base sequence coding for the glucan elicitor receptor having substantially the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing; a DNA or a fragment thereof integrated into plasmid pER 23-1 and containing a base sequence coding for the glucan elicitor receptor; a vector containing the DNA or the fragment thereof; and a plant cell containing the DNA or the fragment thereof incorporated thereinto.</p>		

(57) 要約

実質的に配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプター；実質的に配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含む DNA またはその断片；プラスミド pER 23-1 に組み込まれ、グルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含む DNA またはその断片；前記 DNA またはその断片を含むベクター；および、前記 DNA またはその断片が導入された植物細胞。

情報としての用途のみ

PCT に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に PCT 加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	ババルバドス	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	KE	ケニア	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	KR	韓国	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボワール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	LI	リヒテンシュタイン	NO	ノルウェー	US	米国
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ			PL	ポーランド	VN	ベトナム

明 細 書

グルカンエリシターレセプターおよびそれをコードするDNA

技術分野

本発明は、グリカンエリシターレセプターおよびそれをコードするDNA、該DNAを含むベクター、並びに、該DNAが導入された植物細胞に関し、さらに詳細には、ダイズ根の原形質膜画分に由来する、グルカンエリシターレセプター（ER）およびそれをコードするDNA、該DNAを含むベクター、並びに、該DNAが導入された植物細胞に関するものである。

背景技術

植物は、病原菌に感染すると、ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性物質を新たに合成してこれを蓄積するという抵抗反応を示すことが知られている [M. Yoshikawa (1978) Nature 257: 546]。このような植物の抵抗性反応を誘導する物質が植物疫病菌から見いだされ [N. T. Keen (1975) Science 187: 74]、これらの物質はエリシターと総称されている。植物の病原菌による感染から、ファイトアレキシン合成および蓄積までの生化学的過程は以下のように考えられている。まず、病原菌の菌糸が植物細胞に侵入すると、植物細胞中に存在するグルカナーゼが働いて病原菌の細胞壁表面の多糖を切断してエリシターを遊離させる。このエリシターが植物細胞に存在するレセプターと結合すると、シグナル伝達の役目をするセカンドメッセンジャーが生成され、このシグナル伝達物質が植物細胞の核内に入ってファイトアレキシン合成系酵素をコードする遺伝子転写を活性化し、ファイトアレキシン合成系酵素を誘導する。それと同時にファイトアレキシン分解系が抑制され、効率よくファイトアレキシンが蓄積する。

ダイズの場合、ダイズの抵抗性に大切な役割を果たすファイトアレキシンはグリセオリンと呼ばれ、その構造も決定されている [M. Yoshikawa et al. (1978) Physiol. Plant. Pathol. 12: 73]。また、エリシターはグルコースから作られている多糖で、 $\beta-1, 6$ 結合及び $\beta-1, 3$ 結合したグルカンであることが報告されている [J. K. Sharp et al. (1984) J. Biol. Chem. 259: 11321, M.

Yoshikawa (1990) 植物細胞工学 1.2: 695]。ダイズの病原糸状菌の一種である疫病菌 (*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*) 由来のグルカンエリシターに対する特異的なレセプター (ER) は抗菌性物質であるグリセオリンの合成、蓄積に重要な役割を果たしているタンパク質であると考えられるが、このエリシターに特異的なERに関しては、その精製法が示されているのみであって [E. G. Cosio et al. (1990) FEBS 264: 235, E. G. Cosio et al. (1992) Eur. J. Biochem. 204: 1115, T. Frey et al. (1993) Phytochemistry 32: 543]、そのアミノ酸配列は未だに解明されておらず、いわんや、ERをコードする遺伝子については全く知られていない。

従って、本発明は、グルカンエリシターレセプターを提供することを目的とする。

本発明は、グルカンエリシターレセプターをコードするDNAを提供することも目的とする。

また、本発明は、グルカンエリシターレセプターをコードするDNAを含むベクターを提供することも目的とする。

さらに、本発明は、グルカンエリシターレセプターをコードするDNAが導入された植物細胞を提供することも目的とする。

発明の開示

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意努力した結果、ダイズ根由来のERの精製およびダイズcDNAライブラリーからのER遺伝子のクローニングに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプターを提供する。また、本発明は、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAまたはその断片を提供する。さらに、本発明は、プラスミドpER23-1に組み込まれ、グルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAまたはその断片を提供する。さらにまた、本発明は、グルカンエリシターレセプターをコードするDNAを含むベクターおよびグルカンエリシターレセプターをコードするDNAが導入された

植物細胞を提供する。

図面の簡単な説明

第 1 図は、各カラム処理を行った画分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンの写真である。

第 2 図は、プラスミド pER23-1 および pER23-2 の構成を示す。

第 3 図は、プラスミド pKV1-ER23 の構築の概略図である。

第 4 図は、ダイズ培養細胞にエリシターを添加すると細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇することを示す。

第 5 図は、形質転換タバコ培養細胞にエリシターを添加すると細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇することを示す。

第 6 図は、大腸菌で発現した、ER の全長及び部分長のエリシター結合活性を示す。

第 7 図は、エリシター結合ドメインの抗体によってエリシターとダイズ子葉膜画分中のエリシター結合タンパクとの結合が阻害されることを示す。

第 8 図は、エリシター結合ドメインの抗体によってエリシターが誘導するダイズ子葉のファイトアレキシン蓄積反応が阻害されることを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のグルカンエリシターレセプターは、植物疫病菌、特に *Phytophthora* 由来のグルカンエリシターのレセプターとしての機能、即ち、植物疫病菌、特に *Phytophthora* 属の微生物が細胞内に侵入した際に疫病菌の細胞壁の一部が植物細胞質中の β -1, 3-グルカナーゼによって切り出されて作られるグルカンエリシターと結合し、植物細胞内のファイトアレキシン含量を増大させることをミクロソーム及び核に指示する機能を持つタンパク質である。本発明のグルカンエリシターレセプターは、実質的に配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有する。「実質的に配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列」とは、配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列に加えて、グルカンエリシターレセプターの機能を有している限りにおいて、配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列に幾つかの

アミノ酸の欠失、置換、付加などがあってもよいことを意味するものである。

本発明のグルカンエリシターレセプターは、例えば、Cosioら [E. J. B. (1992) 204: 1115] の方法を一部変更した方法により得られる。即ち、ダイズ、好ましくは、品種グリーンホーマーの根、葉、茎等をホモゲナイズし、得られたスラリーから膜画分を回収し、これをイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、更にエリシターをリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーにより精製することにより得られる。この際用いるエリシターとしては、グリーンホーマーに対して不親和性（病原菌に対して耐性）を示すという点から、*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* レース1 (ATCC34566) 由来のものが好ましい。

上記のようにして得られたグルカンエリシターレセプターのアミノ酸配列は以下のようにして決定することができる。まず、精製したERをPVDF膜（ミリポア社製）にエレクトロブロッティングにより転写し、これをリジルエンドペプチダーゼ（AP-1）にて消化する。断片化されたペプチドをPVDF膜上から回収し、これらを逆相HPLC（ μ -Bondasphere 5 μ C8）にて分画した後、それぞれのピーク画分について、気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社製）で分析する。

本発明のERは、カビに対する耐病性の機構解明やカビ耐性を誘導するエリシターの誘導体の開発に、また、ERに対する抗体を調製するための抗原として有用である。

本発明はグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAおよびその断片を包含する。本発明のDNAは、3' -側末端に接して少なくとも1個の停止コドン（例えばTAG）を持つことが好ましい。

具体的には、本発明は、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAまたはその断片を含む。なお、「グルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNA」とは、縮重異性体をすべて含むものである。ここで、「縮重異性体」とは、縮重コドンにおいてのみ異なっていて、同一のポリペプチドをコードすることのできるDNAを意味する。たとえば配列番号2の塩基配列を有するDNAに対して、そのアミノ酸のどれかに対応するコドン例えばAsnに対応するコ

ドン(AAC)が、これと縮重関係にあるコドン例えばAATに変わったものを縮重異性体と呼ぶこととする。このような縮重異性体の一例としては、配列表の配列番号2に示す塩基配列を含むDNAを挙げることができる。

また、別の見地からすると、本発明は、プラスミドpER23-1に組み込まれ、グルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAまたはその断片を含む。プラスミドpER23-1を導入した大腸菌DH5 α EKB633は、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成6年6月15日付けで寄託され、その微生物受託番号はFERM BP-4699である。

本発明のグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAの断片とは、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである。

本発明のグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAまたはその断片は、所望により、5' -側上流に翻訳フレームと合わせて翻訳開始のメチオニンをコードするATG配列、その5' -側上流および3' -側下流に非翻訳領域として適当な長さの他のDNAが結合してもよい。

本発明のグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAまたはその断片の代表的存在形態は、プラスミドまたはファージDNAの中に構成員の一部としてこのDNAまたはその断片が挿入された形態、並びに、プラスミドまたはファージあるいはゲノムDNAの中にこのDNAまたはその断片が挿入された形で微生物(特に細菌)またはファージ粒子あるいは植物の中に存在する形態である。ここでいう細菌としては、大腸菌やアグロバクテリウムを挙げることができる。

グルカンエリシターレセプターをコードするDNAまたはその断片が植物中で安定に発現しうるように、本発明のDNAまたはその断片に、プロモーター、翻訳開始コドン(ATG)およびターミネーターを、適宜組み合わせて付加してもよい。上記のプロモーターとしては、リブローズ-1,5-2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター(Fluhrら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:2358)、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター(Langridgeら、Plant Cell Rep. (1985) 4:355)、カリフラワーモザイ

クウィルス19S-RNAを生じるプロモーター(Guilleyら、Cell (1982) 30:763)、カリフラワーモザイクウィルス35S-RNAを生じるプロモーター(Odellら、Nature (1985) 313:810)などを用いることができる。ターミネーターとしては、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター(Depickerら、J. Mol. Appl. Gen. (1982) 1:561)、オクトピン合成酵素遺伝子のターミネーター(Gielenら、EMBO J. (1984) 3:835)を用いることができる。

上記のようなグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAを取得する一つの方法としては、核酸合成の方法に従ってそのDNAの少なくとも一部を化学合成し、これをプローブとして使用して、適当なcDNAライブラリーから、慣用されている方法、例えば、免疫学的方法あるいはハイブリダイゼーション法により取得する方法を挙げることができる。上記の方法に用いる幾つかのプラスミド類、様々な制限酵素やT4 DNAリガーゼ、その他の酵素類としては市販のものを使用してよい。また、DNAのクローニング、各プラスミドの構築、宿主のトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのDNA等の回収は文献記載の方法 [Molecular Cloning, J. Sambrook et al., CSH Laboratory (1989), Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1987)他]に準じて行なうことができる。

具体的には、以下のようにして本発明のグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAを取得することができる。まず、グルカンエリシターレセプター中の2種類のアミノ酸部分配列を選択し、これらのアミノ酸配列のC末端側をコードすると考えられるあらゆる塩基の組み合わせのプライマーと前記アミノ酸配列のN末端側をコードすると考えられるあらゆる塩基の組み合わせのプライマーとを作成し、これらをミックスプライマーとして用い、適当なダイズcDNAライブラリーのDNAを鋳型としてPCR反応を行う。その後、PCR反応生成物の中から、増幅が予想される特定の長さの2つの増幅断片(前記の2種類のアミノ酸部分配列をコードするDNAに相当する)を取り出し、これらの塩基配列を決定する。決定された塩基配列を基に、上記の2つのアミノ酸部分配列のうち、グルカンエリシターレセプター中でC末端側に位置するアミノ酸部分配列のC末端側をコードする塩基配列を有するプライマーと、グルカンエリシ

ターレセプター中でN末端側に位置するアミノ酸部分配列のN末端側をコードする塩基配列を有するプライマーとを合成する。これらの2種のプライマーを用いて、前記のダイズcDNAライブラリーのDNAを鋳型としてPCR反応を行う。得られた増幅断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、前記のダイズcDNAライブラリーからグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAを取得する。

上記のようにして得られるグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAの塩基配列の決定は、公知の方法を用いて行うことができる。例えば、マキシムーギルバート法 (Maxam-Gilbert, Methods Enzymol., 65: 499, 1980) や M13 フェージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (J. Messing, et al., Gene, 19: 269, 1982) 等により行うことができる。

グルカンエリシターに関する種々の研究から、グルカンエリシターレセプターが植物におけるカビ耐性に重要な役割を担っていることが示唆されているから、本発明のグルカンエリシターレセプターをコードするDNAまたはその断片を公知の方法に従ってグルカンエリシターレセプターを持たない植物細胞、特に高等植物細胞に導入して発現させれば、カビ耐性を植物に付与することができるものと思われる。また、一般に植物に感染可能なカビはサブレッサーをもち、従来、植物自身もつカビに対する抵抗性を抑制する能力を獲得しているという説が提唱されている。しかし、これらの場合でも、ERが機能するように本発明のグルカンエリシターレセプターをコードするDNAまたはその断片を導入し発現させることや、これらのDNAに改変を加えたり、その発現量を調節することにより、カビにより耐性効果のある植物を新たに育種できる可能性を開くことが期待される。さらに、本発明のDNAまたはその断片をカビ抵抗性を示すグルカナーゼなどカビに対する抵抗性を高める遺伝子や形質と共に植物細胞、特に高等植物に導入し発現させれば、グルカナーゼ等を導入した場合よりもさらに強いカビ抵抗性を植物に付与することができるものと思われる。

グルカンエリシターレセプターをコードするDNAまたはその断片を植物細胞に導入するためのベクターは、グルカンエリシターレセプターが植物体中で安定に発現しうるように構成されればよい。具体的には、グルカンエリシターレセプ

ターをコードするDNAまたはその断片に、プロモーター、翻訳開始コドンにコードするDNA (ATG) およびターミネーターなどが適宜組み合わされて付加されてもよい。上記のプロモーターとしては、リブ羅斯-1,5-2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター(Fluhrら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:2358)、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター(Langridgeら、Plant Cell Rep. (1985) 4:355)、カリフラワーモザイクウィルス19S-RNAを生じるプロモーター(Guilleyら、Cell (1982) 30:763)、カリフラワーモザイクウィルス35S-RNAを生じるプロモーター(Odellら、Nature (1985) 313:810)などを用いることができる。ターミネーターとしては、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター(Depickerら、J. Mol. Appl. Gen. (1982) 1:561)、オクトピン合成酵素遺伝子のターミネーター(Gielenら、EMBO J. (1984) 3:835)を用いることができる。

植物細胞への遺伝子導入方法としては、通常公知の方法、例えば「“Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual”, J. Draper, et al. eds., Blackwell Scientific Publications, 1988」記載の方法を用いて行うことができる。その例としては、生物的方法であるウィルスを用いる方法、アグロバクテリウムを用いる方法など、物理・化学的方法であるエレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって限定されるものではない。

〔実施例1〕 ダイズ根由来のERの精製

1) ERの結合活性測定法

エリシター(平均分子量 10,000)とチラミン(東京化成工業社製)の複合体をJong-Joo Cheong [The Plant Cell (1991) 3: 127] らの方法に従い合成した。次に、エリシターとチラミンの複合体をクロラミンTを用いてヨードラベルした。

アッセイ用緩衝液500 μ l (50mM Tris-HCl pH7.4、0.1M Saccharose、5mM MgCl₂、1mM PMSF、5mM EDTA) 中にサンプル(タンパク量500 μ g以下)を懸濁し、0℃で2時間インキュベートした後、7.0nM ヨードラベル化エリシターチラ

ミン複合体 (70Ci/mmol、モル数の計算はエリシターの分子量を10,000と仮定して行った、以下同様)を加え、4℃で2時間インキュベートした。ワットマン GF/B (0.3%ポリエチレンイミン水溶液で1時間以上処理した)で反応溶液を濾過した後、5mlの氷冷緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.0, 1M NaCl, 10mM MgCl₂)で3回洗浄し、膜上に残った放射活性をガンマカウンターでカウントした (カウントA)。非特異的結合による影響を除くため、同じサンプルに17μMのエリシターを加えアッセイ用緩衝液に懸濁した後、0℃で2時間インキュベートし、上記と同様の操作を行ない、得られたカウントを上記のカウントAから差し引きすることにより、ERの特異的結合によるカウント (Δcpm)を求めた。得られたカウント数 (Δcpm)と、実験に用いた全カウント数の商を求め、次いで実験に用いた全エリシター量との積を求めることでエリシター結合蛋白量 (mol数)を計算した。

ERの精製は、本測定法を用いて行った。

2) ダイズ根由来のERの精製

ダイズ (グリーンホーマー) 種子 (タカヤマシード社製) を1週間バーミキュライトで栽培した後、15日間水耕栽培を行ない、根を湿重約40Kg収穫した。収穫した根は精製に使用するまで-80℃で凍結保存した。湿重2Kgの根に対して1.25Lの氷冷懸濁緩衝液 (25mM Tris-HCl pH7.0, 30mM MgCl₂, 2mM Dithiothreitol, 2.5mM メタ重亜硫酸カリウム, 1mM PMSF)を加え、ワーリングブレンダーで2分間ホモゲナイズした。

得られたスラリーをミラクロス (カルビオケム社製) で濾過し、濾液を9,000rpm、4℃で15分間遠心した。上清を37,000rpm、4℃で、20分間超遠心し、沈殿を氷冷緩衝液160ml (25mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1M シュークロース, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA) に懸濁して膜画分を得た。ERを膜画分より可溶化するため、終濃度0.25%となるよう両イオン性界面活性剤ZW3-12 (ベーリンガー社製)を加え、8℃で30分間攪拌した。可溶化されたERを回収するため、37,000rpm、4℃で20分間超遠心を行ない、上清を回収した (可溶性画分)。可溶性画分165mlを緩衝液 (50mM, Tris-HCl pH 8.0, 0.2%ZW3-12, 4℃) 2Lで4回透析した後、サンプル中よりプロテアーゼを除きERを安定化するため、プロトラ

ップ（宝酒造社製）5mlを加え、8℃で、30分間ゆっくり攪拌した。その後、遠心（2,800rpm, 4℃, 2分間）し、上清を回収した。得られた上清160mlを、限外濾過膜YM-10（アミコン社製）を用いて、約50mlに濃縮した後、A緩衝液（50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1Mシュクロース, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA, 0.2%ZW3-12, 4℃）に透析した。

次いで、Q-セファロースHP 26/10（ファルマシア社製）にアプライし、0から1M NaClのリニアグラジエントを行なってERを溶出した（Q-Sepharose 活性画分）。ERはNaCl濃度0.45M付近に溶出された。Q-Sepharose 活性画分をA緩衝液で3倍に希釈した後、MonoQ10/10（ファルマシア社製）にアプライし、0から1M NaClのリニアグラジエントを行なってER画分8mlを溶出した（MonoQ 活性画分）。ERはNaCl濃度0.25M付近に溶出された。

最後に、エリシターをリガンドとしたアフィニティーゲルによりERを精製すべく以下の操作を行なった。まず、エリシターはN. T. Keen [Plant Physiol. (1983) 71: 460, Plant Physiol. (1983) 71: 466] らの方法を一部変更し、以下のようにして調製した。疫病菌（*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*）レース1（ATCC34566）の細胞壁をザイモリアーゼ100T（キリンビール社製）で処理しエリシターを遊離させた後、CM-セルロースにザイモリアーゼ100Tを吸着させ、得られた素通り画分をゲル濾過G-75（ファルマシア社製）にて精製して平均分子量1万の画分を回収した。回収画分のグリセオリンを誘導するエリシター活性をM. Yoshikawa [Nature (1978) 257:546] の方法にしたがって測定したところ、8 μgのエリシターをダイズの子葉に与えると、24時間後に約550 μgのグリセオリンが誘導された。

ゲル担体に対する非特異的吸着を除くため、MonoQ 活性画分を集め、約33mgのマルトース結合ガラスゲル（ベッド体積約100 μl）と8℃で1時間攪拌し、ゲルを遠心（1,000 rpm, 4℃, 2分間）で沈殿させ、上清を回収した（マルトース結合ガラスゲル素通り画分）。なお、マルトース結合ガラスゲルは、A. M. Jeffrey et al. [Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975) 62: 608] らの方法に従って以下のようにして作製した。マルトース120mgとGlass, Aminopropyl（シグマ社製）6gを36mlのH₂Oに懸濁し、室温で一晩攪拌した。これにエタノー

ル36mlを加え、その直後、72mlのエタノールに864mgの硼水素化ナトリウムを溶解したものに加え、2分間ソニケートし、5時間室温で攪拌した。288mlのH₂Oを加えて氷冷し、酢酸でpH5.6に調製した。結合しなかったマルトースを除くため、ゲルを約1.8lのH₂Oで洗浄した。洗浄液中に含まれるマルトースをアンスロン試薬を用い、J. H. Roe[J. Biol. Chem. (1955) 212: 5]の方法に従って定量し、洗浄液中に含まれるマルトースの量から、ゲルに結合したマルトース量を推定した。その結果、6gのGlass Aminopropylに対して60mgのマルトースが結合したことがわかった。

マルトース結合ガラスゲル素通り画分8mlに、約17mgのエリシター結合ガラスゲル(ベッド体積約50 μ l)を加え、8℃で一晩ゆっくり攪拌した。遠心(1,000 rpm, 4℃, 2分間)で、ゲルを回収し、2ベッド体積のA緩衝液で2回洗浄した。4ベッド体積の0.1%SDSで3回洗浄し、ゲルに結合したERを回収した(エリシター結合ガラスゲル溶出画分)。なお、エリシター結合ガラスゲルは、A. M. Jeffrey et al. [Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975) 62: 608]の方法に従って以下のようにして作製した。エリシター37mgとGlass Aminopropyl 490mgを6mlのH₂Oに懸濁し、室温で一晩攪拌した。これにエタノールを6ml加え、その直後、12mlのエタノールに144mgの硼水素化ナトリウムを溶解したものに加え、2分間ソニケートし、5時間室温で攪拌した。48mlのH₂Oを加え、氷冷し、酢酸でpH5.6に調製した。結合しなかったエリシターをアンスロン試薬を用いて定量し、洗浄液中に含まれるエリシターの量から、ゲルに結合したエリシター量を推定した。その結果、490mgのGlass Aminopropylに対して、34mgのエリシターが結合したことがわかった。

以上の各精製ステップにおけるタンパク質量及びER量を第1表に示す。

第1表. 各精製ステップにおけるタンパク質量及びER量
(ダイズ根、湿重約40kgを出発材料とした)

	タンパク質 (mg)	ER量 (pmol)
膜画分	17900	30
可溶化画分	2000	214
Q-Sepharose 活性画分	190	205
MonoQ 活性画分	49	233
マルトース結合ガラスゲル素通り画分	45	220
エリシター結合ガラスゲル溶出画分	0.004*	45

* SDS-PAGEを銀染色したとき得られたバンドの濃さで推定した。

上記のMonoQ活性画分、マルトース結合ガラスゲル素通り画分およびエリシター結合ガラスゲル溶出画分（各10 μ l）を電気泳動用グラジエントゲル、SDS-PAGEプレート10/20（第一化学薬品社製）を用いて電気泳動し、銀染色（第一化学薬品社製）により染色した。これらの電気泳動のパターンを第1図に示す。第1図中のレーン1はMonoQ活性画分、レーン2はマルトース結合ガラスゲル素通り画分、レーン3はエリシター結合ガラスゲル溶出画分を示す。第1図が示すように、ERのバンドは、分子量約70,000付近に検出された。

分子量約70,000に検出されたタンパク質がエリシター結合活性を持つことは、フォトアフィニティー試薬、SASD（ピアス社製）とエリシターの複合体をヨードラベル化したものを用いて、分子量約70,000のタンパク質がヨードラベル化されたこと、および、膜画分のSDS-PAGEをPVDF膜へウエスタンブロッティングし、PVDF膜をERの結合能活性測定に用いたのと同じヨードラベル化エリシターとインキュベートしたところ、分子量約70,000のタンパク質がヨードラベル化されたことより示された。

上述の方法により、湿重約40kgの根から約4 μ gのERが精製された。

3) ERの断片化ペプチドの分析

ERをプロテアーゼ消化によってペプチド断片化して、岩松の方法〔岩松明彦、生化学、(1991) 63:139、A. Iwamatsu, Electrophoresis (1992) 13:142〕によって断片化ペプチドのアミノ酸配列を決定した。上述の方法で精製したERの溶液をセントリコン-30（アミコン社製）で約100 μ lに濃縮し、10-20%

ポリアクリルアミドSDS電気泳動を行なった後、各バンドをPVDF膜（ミリポア社製）へエレクトロブロットング装置（Sartrius社製）により転写した。転写されたPVDF膜を0.1% Ponceau S（シグマ社製）/1% 酢酸で染色し、分子量約70,000のメインバンドを切り取り、0.5mM NaOHで脱色した。これを還元S-カルボキシメチル化し、リジルエンドペプチダーゼ（AP-I）を酵素：基質（mol:mol）比で1：100になるよう加え、30℃で16時間反応させた。生成した断片化ペプチドを溶媒A 98%と溶媒B 2%で平衡化した μ -Bondasphere 5 μ C8-300Å（2.1x150mm, Waters）カラムにアプライし、溶媒Bに関し2-50%のリニアグラジエントで30分間、流速0.25ml/分で溶出した（溶媒A：0.05%TFA水溶液、溶媒B：2-プロパノール：アセトニトリル=7：3（v/v）中の0.02%TFA）。溶出されたペプチドを214nmにおける吸収で検出し、それぞれのピーク画分をマニュアルで集めた。得られたそれぞれのピーク画分は、気相プロテインシーケンサー（Applied Biosystems Model 470A）を用いて分析した。すべての得られたピーク画分を分析した結果、以下の断片化ペプチドアミノ酸配列が明確に決定された。

#1:Val Asn Ile Gln Thr Asn Thr Ser Asn Ile Ser Pro Gln（N-末端）

#5:Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val Gly Asp Ser

#6:Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp

#7:Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile Lys（ミックス配列）

〔実施例2〕 ダイズERのクローニング

1) ダイズmRNAの取得

ダイズ（グリーンホーマー）種子（タカヤマシード社製）を1週間バーミキュライトで栽培した後、15日間水耕栽培を行ない、根を湿重約40Kg収穫した。その一部を液体窒素により凍結し使用するまで-80℃で保存した。石田（細胞工学実験操作入門 講談社サイエンティフィク）らの方法に従い全RNAの取得を行なった。凍結保存した根（湿重28.5g）に液体窒素を加えながら乳鉢で粉末状にした。この粉末に、65℃に保温したGTC溶液35.6mlを加えワーリングブレンダーで攪拌し、得られた懸濁液を6,000rpm、15分間、室温で遠心し上清40mlを回収した。セシウムクッション液をあらかじめ入れた遠心管に得られた上清を静かに重層し、

35,000rpm、20時間、25℃で遠心した。得られた沈殿に9mlのTE/0.2%SDSを加えて溶解した。2回フェノール/クロロホルム抽出を行なった後、エタノール沈殿で4.37mgの全RNAを回収した。

上記で得られた全RNA2.2mgをオリゴテックス-d T30（日本ロッシュ社製）を用いてマニュアルに従い精製し、68μgのpoly(A)+RNAを精製した。

2) ダイズcDNAライブラリーの作成

5μgのpoly(A)+RNAをcDNA合成キット（ファルマシア社製）を用いて、マニュアルに従い、cDNAを合成した。合成したcDNA断片はラムダファージベクターλgt10（ストラタジーン社製）にT4リガーゼ（宝酒造社製）を用いて連結した。さらにDNA混合溶液を用いて、ファージ粒子にギガパック（ストラタジーン社製）を用いてパッケージングし、約150万pfuのダイズのcDNAライブラリーを作成した。このライブラリーを増幅して 1.6×10^{11} pfu/ml、160mlのダイズcDNAライブラリーを得た。

cDNAライブラリーの全DNAは以下の様に調整した。500μlのファージ液（ 1.6×10^{11} pfu/ml）を等量のクロロホルム/イソアミルアルコール（24:1）を加えて30秒間振とうした後、遠心分離により水層を回収した。クロロホルム/イソアミルアルコール（24:1）により再抽出した後、水層に5μlの3M酢酸ナトリウムpH5.4溶液と125μlのエタノールを加えて遠心し、沈殿を回収した。この沈殿を70%エタノール溶液で洗浄後、1μg/ml RNaseA（シグマ社製）を含む10mMトリス塩酸pH8溶液に溶解し、これをPCR法の鋳型として使用した。

3) ダイズERのcDNA断片のPCR法による増幅とクローニング

実施例1で得られた断片化ペプチドのアミノ酸配列（#5と#6）を基にミックスプライマーとして、

プライマーU5 5'-AARAGYATHGAYGGNGA-3'

プライマーU7 5'-WRTCNCNACNAC-3'

プライマーU10 5'-GTNAAYAARATNCARAC-3'

プライマーU12 5'-ARRTTNAGRAARTCYTC-3'

(R : A/G、Y : C/T、W : A/T、H : A/C/T、N : A/G/T/C)

の4種類のオリゴデオキシヌクレオチド（プライマーU5；プライマーU7；プライマーU10；プライマーU12）を自動核酸合成機（アプライドバイオシステム社モデル394）を用いて合成した。

0.5 μ g のcDNAライブラリー中の全DNAを79 μ lの蒸留水に溶解し、10 μ lの10x PCRバッファー（宝酒造社製Taq DNAポリメラーゼに添付）、8 μ lの2.5mM dNTPにプライマーU5とU7もしくはU10とU12をそれぞれ100 pmolずつ及び0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を加え最終量100 μ lとし、以下のようにPCR反応を行なった。反応装置はパーキンエルマー社製ジーンアンプPCRシステム9600を用いた。反応は、1）変性94℃；30秒、2）再生47℃；30秒、3）伸長72℃；1分の操作を50回繰り返して行った。反応後、反応液の15 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。電気泳動に供した上記ゲルを0.5 μ g/mlの臭化エチジウム溶液で10分間染色し、UV下で観察して、それぞれ増幅が予想される40 bpと47 bpの特異的増幅断片を示すバンドを切り出した。同ゲル断片をプラスチック棒で粉碎後、溶出バッファー（0.5M酢酸アンモニウム、10mM酢酸マグネシウム、1mM EDTA、0.1% SDS）で1晩溶出し、DNAを含む溶液を回収した。

回収したDNA断片をプラスミドpT7Blue(R)にpT7Blue T-Vector Kit（ノバゲン社製）を用いてクローニングし、得られたプラスミドp#5-1, 2, p#6-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9を蛍光プライマー・サイクル・シーケンス・キット（アプライドバイオシステム社製）と蛍光自動DNAシーケンサー（アプライドバイオシステム社モデル373A）を用いてDNAの配列を決定した。その結果、得られた増幅DNA断片のプライマー以外の部分は、#5および6の断片化ペプチドのアミノ酸配列をコードしていた。

上記DNA配列決定の結果を基にして、ミックスプライマーとして

プライマーU18 5'-AAGTAYAAGCCRCAAGCCTATTCA-3'

プライマーU19 5'-ATCGCCRACAACMCCAA-3'

（YおよびRは上記のとおり、M：A/C）

とする2種類のオリゴデオキシヌクレオチド（プライマーU18；プライマーU19）を自動核酸合成機を用いて合成した。

0.5 μ g の cDNA ライブラリーの全 DNA を 79 μ l の蒸留水に溶解し、10 μ l の 10x PCR バッファー、8 μ l の 2.5mM dNTP にプライマー U18 と U19 をそれぞれ 100 pmol ずつ及び 0.5 μ l の Taq DNA ポリメラーゼを加え最終量 100 μ l とし、PCR 反応を行なった。反応は、1) 変性 94 $^{\circ}$ C ; 30 秒、2) 再生 52 $^{\circ}$ C ; 30 秒、3) 伸長 72 $^{\circ}$ C ; 1 分の操作を 40 回繰り返して行った。反応液の 15 μ l を 1% アガロースゲル電気泳動にかけた。

電気泳動に供した上記ゲルを 0.5 μ g / ml の臭化エチジウム溶液で 15 分間染色し、UV 下で観察して、特異的に増幅が観察できた約 540bp の増幅断片のバンドを切り出した。同ゲル断片はジーンクリーン II (バイオ 101 社製) によって処理し、DNA を含む溶液を回収した。

回収した DNA 断片をプラスミド pT7Blue(R) に pT7Blue T-Vector Kit を用いてクローニングし、得られたプラスミド p#5-#6 の DNA の配列を蛍光シーケンサーにて決定した。得られた増幅 DNA 断片は、539bp からなり、#5 および 6 の断片化ペプチドのアミノ酸配列をコードしており、増幅した部分には #7 の断片化ペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列が存在することがわかった。

4) ハイブリダイゼーションによるライブラリーのスクリーニングとクローニング

ER の cDNA 断片がクローニングされているプラスミド p#5-#6 の、制限酵素 BamHI および PstI によって切り出される DNA 断片 (約 540bp) を回収し、プローブとして用いた。回収された DNA 断片をメガプライム DNA 標識システム (アマシャム社製) を用い、マニュアルに従って [α - 32 P]dCTP にてラベル化し、反応液をハイブリダイゼーションの実験に供した。

ファージライブラリーを大腸菌 C600 hfl (インビトロジェン社製) に感染させ、10 mg / ml の $MgCl_2$ を含む L 培地を入れた直径約 15 cm のシャーレにまいて総数約 100 万個のプラークを形成させた後、ナイロンメンブレン (Hybond-N; アマシャム社製) にブロッティングした。 32 P-dCTP で標識したエリクター受容体 cDNA 断片をこのメンブレンと反応させ、オートラジオグラフィーによって検出した陽性ファージを再度同様にスクリーニングすることにより、シグナル強度の異なる約 30 個のファージクローンを得た。この中から挿入 DNA 断片の最も長

いクローンλ ER23を選択した。

ハイブリダイゼーション実験より単離したポジティブなクローンλ ER23のファージ液からラムダソープ（プロメガ社製）を用いてλファージDNAを精製した。5 μgのDNAに10 μlの10 x EcoRI切断バッファー制限酵素EcoRI 10 Uを加え、全量を100 μlとし37℃で一晩反応させた。反応液を1%アガロースゲル電気泳動で分離し、約2.3 kbのバンドを切り出し、ジーンクリーンII（バイオ101社製）によって処理し、DNAを含む溶液を回収した。一方、0.02 μgのベクターpBluescriptII KS-（ストラタジーン社製）を制限酵素EcoRIで切断した。

両DNA溶液を混合し、2 μlの10 x リガーゼバッファーと0.2 μlのT4 DNAリガーゼ（宝酒造製）を加え、全量20 μlとして16℃で4時間反応させ、この反応混合溶液を用いて大腸菌DH5α（ギブコBRL社製）を形質転換した。50 μg/mlアンピシリン、40 μg/ml IPTG、40 μg/ml X-galを含むL培地25 mlで2%寒天平板培地を作成した。同培地に形質転換した大腸菌をまき、37℃1晩生育させた。生育した菌のうち、白色のコロニーを示す菌を選び、3 mlの50 μg/mlのアンピシリンを含むL培地で37℃で8時間培養した。これらの菌からアルカリ法にてプラスミドを回収し、制限酵素にて正しい断片がクローニングされたクローンであるかどうかを調べ、ベクターに対する方向を異にするプラスミドpER23-1とpER23-2(5225bp)を得た。プラスミドpER23-1およびpER23-2の構成を第2図に示す。

5) ERをコードするクローンのDNA塩基配列の決定

ERのcDNAがクローニングされているプラスミドpER23-1とpER23-2を適当な制限酵素を用いるか、塩基配列の決定した部分から適当なプライマーを合成し用いるか、前者プラスミドは制限酵素KpnIとXhoIで、後者プラスミドは制限酵素KpnIとClaIで切断後、キロシーケンス用ディリレーションキット（宝酒造製）を用いて、ほぼ200-300bpごとに欠失したプラスミドを作成するかを行ない、これらを用いて蛍光シーケンサーで両方向のDNA塩基配列を決定した。そのDNA塩基配列を配列表の配列番号2に示す。その結果、そのDNA断片中にはアミノ酸シーケンサーで決定されたN-末端からの配列（#1の断片化ペプチド）に対

応する塩基配列を先頭に2001bpからなるORFが存在し、667残基のアミノ酸がコードされていると推定された。このアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。得られたDNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列は先に決定したダイズERのアミノ酸配列と一致した。

さらに、核酸およびアミノ酸配列の解析ソフト（マックベクター：コダック社製）と核酸およびアミノ酸配列のデータベース（Entrez：NCBI社製）を用いて相同性の高いアミノ酸配列の検索を行なったところ、現在まで知られている配列と強い相同性を示すものは確認できなかった。従って、前記のERは全く今まで知られていなかった新規のタンパク質であることが明らかとなった。

〔実施例3〕 ダイズERのタバコ植物での発現

1) 植物体発現プラスミドpKV1-ER23の構築

まず、第3図に示すように、カリフラワー・モザイクウィルスの35Sプロモーターを含むプラスミドpCaP35J [J. Yamaya et al. (1988) Mol. Gen. Genet. 211:520]を基にして、本実施例で用いる植物体発現ベクターpKV1を以下のように作製した。まず、pCaP35Jの35Sプロモーターの上流域にある多クローニング部位を欠失する目的で制限酵素BamHIで完全消化した後、PvuIIで部分消化後、クレノウ断片（宝酒造社製）処理を施し平滑化した後、ライゲーション反応を行ない環状化した。これを大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドを得た。さらに35Sプロモーターの下流域に多クローニング部位を挿入する目的で制限酵素PstIで消化後、クレノウ断片処理を施し平滑化した。さらにHindIIIで消化して、自動核酸合成機を用いて合成した下記に示す合成リンカー用DNAをアニーリングした後、ライゲーションで組み込み、大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドpCaP35Y（2837bp）を得た。

5'-GGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA-3'（配列番号3）

5'-CCTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCCA-3'（配列番号4）

上記のpCaP35Yにノパリン合成酵素のターミネーターを導入する目的で、

pBI121 (クローンテック社製) の断片 (SacI-EcoRI断片を分離しクレノウ断片で平滑化したもの) をプラスミドpCaP35Yの35Sプロモーターの下流のHindIII部位をやはり平滑化したものとライゲーションで組み込み、大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドを得た。このプラスミドにカナマイシン耐性カセットを導入する目的で、このプラスミドをPvuIIで消化して、pLGVneo1103 [R.Hain et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 161] の断片 (オクトピン合成酵素ターミネーター下流に存在するPvuII部位で切断後、Bal31 (宝酒造製) 処理を施し、欠失を生じさせた。さらにノパリン合成酵素プロモーターの上流はEcoRI部位で切断後、両端を平滑化したもので約1620bpになる断片) をライゲーション反応で連結し、これを大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドである植物発現用ベクターpKV1 (4828bp) を得た。

作成したpKV1を単一制限酵素であるBamHIとSalIで消化し、ER遺伝子を含む断片 (pEB23-1のBamHI-SalI断片、約2.3kbp) をライゲーションで組み込み、これを大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のER発現用プラスミドpKV1-ER23 (約7.1Kbp) を得た。

2) ERのタバコ培養細胞での一過的発現

電気穿孔法によるERのタバコ培養細胞での一過的発現は渡辺らの方法 [Y.Watanabe (1987) FEBS 219: 65] を一部改変して行なった。上記で作成したプラスミドpKV1-ER23のDNA はアルカリ法によって精製した。一過的発現のためのタバコ培養細胞の取得は平井らの植物細胞育種入門 (学会出版センター1982) に従って行った。タバコ (品種ブライトイエロー: 東京大学内宮博文教授より分与) の種子を1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で滅菌したのち発芽させ、発芽直後のタバコ幼組織をタバコ培養用寒天培地 (ムラシゲとスクーグ培地: フローララボラトリー社製に2ppm 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、3%蔗糖と0.8%寒天) に植え込み、3週間でカルスを誘導した。約1gのカルス塊を50mlのタバコ培養用培地 (ムラシゲとスクーグ培地: フローララボラトリー社製に2ppm 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、3%蔗糖) に懸濁し培養細胞を作製した。これらのタバコ培養細胞を植え継ぎで対数増殖期にした後、遠心分離器 (600rpm, 3分間) で回収し、

1%セルラーゼ・オノヅカ（ヤクルト社製）、1%ドリセラーゼ（協和発酵社製）、0.1%ペクトリアーゼ（盛進製薬社製）、0.4M D-マンニトール（和光純薬社製）HClでpH 5.7に調製したものに懸濁し、30℃90分間反応しプロトプラストを作成した。遠心を3回繰り返すことにより、4℃の0.4M D-マンニトールで洗い酵素液を取り除いた。電気穿孔法の一回の操作は 1×10^6 の細胞を0.8 mlの電気穿孔用溶液（70 mM KCl, 5 mM MES, 0.3 Mマンニトール）に懸濁し、10 μ gのpKV1-ER23のDNAと混ぜ、電気穿孔用キュベット（バイオラッド社製、電極間0.4 cm）に入れ、ジーンパルサー（バイオラッド社製）を用い、125 μ F、300Vで処理を行なった。処理後、パスツールピペットで回収した溶液を氷上で30分放置した後30℃で5分反応させ、遠心分離によりプロトプラスト培地（ムラシゲとスクーグ培地：フローララボラトリー社製に0.2 ppm 2,4-D、1%蔗糖、0.4Mマンニトールを添加しpH5.7に調製）に再懸濁した。細胞をその後、暗所25℃で一晩静置培養した後、遠心（8,000rpm, 3分間）で回収し、60 μ lの懸濁緩衝液（25mM Tris-HCl pH7.0, 30mM MgCl₂, 2mM Dithiothreitol, 2.5mM メタ重亜硫酸カリウム, 1mM PMSF）を加え3分間ボルテックスで攪拌した。得られた標品はエリクター結合実験を行なうまで-80℃で保存した。

対照として、pKV1-ER23のDNAの代わりにpKV1のDNAをタバコ細胞に導入した他は上記の操作を繰り返した。

3) ERのタバコ培養細胞での定常的発現

定常的にER遺伝子を保持する形質転換タバコ培養細胞は以下のようにして一過的発現のタバコ培養細胞から選別した。

前述した一過的発現のタバコ培養細胞の作成で得られたプロトプラストを1%アガロースを含んだプロトプラスト培地（ムラシゲとスクーグ培地：フローララボラトリー社製に0.2 ppm 2,4-D、1%蔗糖、0.4Mマンニトールを添加しpH5.7に調製）に懸濁し、アガロースが固化する前にシャーレにスポイトで懸濁液を滴下して、プロトプラストをビーズ状の固形培地に固定した。アガロースが固まった後、シャーレにアガロースを含まないプロトプラスト培地を加えプロトプラストを固定したアガロース培地を液体培地で浸した。暗所で一週間培養した後に終濃度100 μ g/mlのカナマイシンを加え、更に培養を継続し、増殖してきたコロニー

を選別して得られた形質転換体をカナマイシンを含む液体培地に移し培養した。

定常的にpKV1-ER23を保持する形質転換タバコ培養細胞が2クローン (I 1, I 6)、対照として、定常的にpKV1を保持するタバコ培養細胞が2クローン (C 2-1, C 2-4) それぞれ得られた。

4) エリシター結合実験

ERの結合活性は以下のようにして測定した。エリシターとチラミン (東京化成工業社製) の複合体をJong-Joo Cheong [The Plant Cell (1991) 3: 127] らの方法に従い合成した。次に、エリシターとチラミンの複合体をクロラミンTを用いてヨードラベルした。500 μ l のアッセイ用緩衝液 (50mM Tris-HCl pH7.4, 0.1M Saccharose, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA) 中に、得られた標品 (タンパク量500 μ g以下) を懸濁し、0 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした後、100nM ヨードラベル化エリシターチラミン複合体 (70Ci/mmol) を加え、4 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。ワットマンGF/B (0.3%ポリエチレンイミン水溶液で1時間以上処理した) で反応溶液を濾過した後、5mlの氷冷緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.0, 1M NaCl, 10mM MgCl₂) で3回洗浄し、膜上に残った放射活性をガンマカウンターでカウントした (カウントA)。非特異的結合による影響を除くため、同じサンプルに17 μ Mのエリシターを加えアッセイ用緩衝液に懸濁した後、0 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートし、上記と同様の操作を行ない、得られた放射活性のカウントを上記のカウントAから差し引きすることにより、ERの特異的結合によるカウント (Δ cpm) を求めた。得られたカウント数 (Δ cpm) と、実験に用いた全カウント数の商を求め、次いで実験に用いた全エリシター量との積を求めることでエリシター結合蛋白量 (mol数) を計算した。

その結果、対照としてpKV1のDNAを導入したタバコ細胞ではエリシターとの特異的な結合が観察されなかったが、pKV1-ER23のDNAを導入したタバコ細胞ではエリシターとの特異的な結合が観察された (第2表)。よって、上記のようにして得られた遺伝子はエリシター結合活性を持つタンパクをコードすることが明らかになった。

第2表. タバコ培養細胞のエリシター結合活性

画分	導入したDNA	結合活性 (fmol/mg)
一過的発現	pKV1	< 0
	pKV1-ER23	90.5
定常的発現		
C2-1	pKV1	< 0
C2-4	pKV1	< 0
I 1	pKV1-ER23	150
I 6	pKV1-ER23	196

5) グルカンエリシターの添加による、形質転換タバコ培養細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過的上昇

植物はエリシターをそれに対する特異的な受容体で認識し、ファイトアレキシンの蓄積を促進したり過敏感反応を誘導したりしてカビの侵入を防いでいる。これら抵抗性反応の初期にカルシウムイオンが細胞内に流入することが重要であるとの報告がいくつかの植物においてすでになされており[U. Conrath et al. (1991) FEBS LETTERS 279: 141, M. N. Zook et al. (1987) Plant Physiol. 84: 520, F. Kurosaki et al. (1987) Phytochemistry 26: 1919, C. L. Preisig and R. A. Moreau (1994) Phytochemistry 36: 857]、我々がERを取得する材料に用いたダイズにおいてもカルシウムイオンが細胞内に流入することが引き金となってファイトアレキシンの蓄積が促進される事を示唆する報告がなされている[M. R. Stab and J. Ebel (1987) Arch. Biochem. Biophys. 257: 416]。そこで、ERをもたないタバコ培養細胞に受容体を導入発現させた形質転換タバコ培養細胞を作成し、グルカンエリシター添加によって細胞内カルシウムイオン濃度が変化するようになればその変化が引き金となってダイズ以外の植物

(タバコ)でもグルカンエリシターによって抵抗性反応が誘導され、グルカンを経細胞壁成分の一つとする幅広い種類のカビに対して抵抗性を示すようになることが期待される。

そこで、形質転換タバコ培養細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度のエリシター添加による影響を調べた。

ここでタバコ培養細胞は、カナマイシン選抜で得られた形質転換タバコ培養細胞(16)及びプラスミドのみ導入したタバコ培養細胞(C2-4)を用いた。

培養細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} 測定用蛍光キレーター (Fura-2) のアセトキシメチル誘導体 (Fura-2 AM) を用いて以下のように測定した。

形質転換タバコ培養細胞約2mlを取り (10分間静置で細胞体積約250 μ lに当たる)、600rpm、30secで細胞を集め上清を捨てた。2mlのタバコ培養用培地を加え、軽く攪拌した後遠心 (600rpm, 30sec) し、上清を除き、再度同様の操作を繰り返し培養細胞を洗浄した。洗浄した培養細胞に培地2mlを加え、均一になるよう懸濁し、培地に懸濁した培養細胞1mlを取り、1mlの培地と4 μ lの1mM Fura-2 AM (終濃度2 μ M、同仁化学社製) を加え、30分間室温暗所で時々攪拌しながらインキュベートした。その後、遠心操作 (600rpm, 30sec) により2mlの培地で2回細胞を洗浄し、細胞内に取り込まれなかったFura-2 AMを取り除いた。洗浄した培養細胞に2mlの培地を加え、培養細胞を均一に懸濁して培養細胞2mlを蛍光測定用セルに移した。細胞内に取り込まれたFura-2 AMは細胞内エステラーゼにより加水分解を受けてFura-2に変化する。このFura-2が細胞内 Ca^{2+} と結合することによって生ずる蛍光を励起波長335nm、蛍光波長505nmで、培養細胞が沈殿しないようにスターラーで攪拌しながら、測定した。50 μ lのグルカンエリシター (1mg/ml) ないしは脱イオン水を培養細胞に添加して蛍光強度を経時的に測定し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べた。対照実験としてプラスミドのみを導入したタバコ培養細胞についても上記と同様の操作で細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べた。また更に、別の対照実験としてダイズ培養細胞についても上記と同様の操作 (但し、培養細胞の洗浄にダイズ細胞用の培地を使用した) を行なった。

ダイズ細胞用の培地組成を以下に記す (NaH₂PO₄・H₂O 75mg/ml, KH₂PO₄ 170mg/ml, KNO₃ 2,200mg/ml, NH₄NO₃ 600mg/ml, (NH₄)₂SO₄ 67mg/ml,

MgSO₄·7H₂O 310mg/ml, CaCl₂ 2H₂O 295mg/ml, FeSO₄·7H₂O 28mg/ml, EDTA·Na₂ 37.3mg/ml, KI 0.75mg/ml, MnSO₄·4H₂O 10.0mg/ml, H₃BO₃ 3.0mg/ml, ZnSO₄·7H₂O 2mg/ml, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25mg/ml, CuSO₄·5H₂O 0.025mg/ml, CoCl₂·6H₂O 0.025mg/ml, Inositol 100mg/ml, Nicotinic acid 1.0mg/ml, Pyridoxine·HCl 1.0mg/ml, Thiamine·HCl 10.0mg/ml, Glucose 5g/ml, Sucrose 25g/ml, Xylose 250mg/ml, Sodium pyruvate 5.0mg/ml, Citric acid 10.0mg/ml, Malic acid 10.0mg/ml, Fumaric acid 10.0mg/ml, N-Z-amine 500.0mg/ml, 2,4-D 1.0mg/ml, Zeatine riboside 0.1mg/ml, KOH でpH5.7に調製する)。

これらの実験を行なった結果、ダイズ培養細胞ではエリシター添加3分後に約7%蛍光強度が一過的に上昇したが、脱イオン水の添加ではそのような変化は観察されなかった(第4図)。この結果は、本実験法によってERがグルカンエリシターと結合することによって一過的に細胞内にCa²⁺を流入させる現象を観察できることを示唆しており、ダイズ培養細胞でエリシターによって引き起こされる抵抗性反応にカルシウムイオンが重要な役割を果たしているとの報告を支持している。形質転換タバコ培養細胞ではエリシター添加3分後に約10%蛍光強度が一過的に上昇したが、脱イオン水の添加ではそのような変化は観察されなかった。

また、プラスミドのみを導入したタバコ培養細胞では形質転換タバコ培養細胞で生じたエリシター添加による蛍光強度の変化は観察されなかった(第5図)。

これらの結果はグルカンエリシターに反応性の無かったダイズ以外の植物(タバコ)にダイズ由来のグルカンエリシター受容体を導入発現させるとグルカンエリシターに対する反応性を新たに獲得する事を示している。それぞれの植物におけるシグナル伝達経路に関しては未だ未知の部分が多く残されているが、タバコ以外の植物でも本ERを導入発現させればグルカンエリシターに対する反応性(細胞内Ca²⁺濃度の一過的な上昇)を獲得し、ひいてはグルカンをその細胞壁成分の一つとする幅広い種類のカビに対して抵抗性を示す植物の育種が可能になると期待される。

〔実施例4〕 ダイズERの大腸菌での発現とエリシター結合ドメインの決定

1) 大腸菌でのエリクター結合ドメインの発現

ダイズERの部分断片を大腸菌で発現させるためマルトース結合蛋白(MBP)との融合蛋白の作成をニューイングランドバイオラボ社製のProtein Fusion & Purification Systemを用いて行なった。pER23-1を鋳型に用いてPCRを行ない、様々な長さのDNA断片を取得した。プライマーは、第6図に示すダイズERの全長および断片をコードするDNAの外側に、5'側はBamHI部位を、3'側はSalI部位をあらかじめ付加しておき、プラスミドpMAL-c2(ニューイングランドバイオラボ社製)にクローニングした際にMBPと融合蛋白が産生するようにデザインした。これらプライマーを自動核酸合成機(アプライドバイオシステム社モデル394)を用いて合成した。DNA鎖の増幅には以下のプライマーを用いた。

プライマーU35 5'-ATGGATCCATGGTTAACATCCAAACC-3'

プライマーU36 5'-ATGGATCCGAATATAACTGGGAGAAG-3'

プライマーU37 5'-ATGGATCCCCAGCATGGGGTAGGAAG-3'

プライマーU38 5'-TAGTCGACTACTTCTCCCAGTTATATTC-3'

プライマーU39 5'-TAGTCGACTACTTCTACCCCATGCTGG-3'

プライマーU40 5'-TAGTCGACTATTCATCACTTCTGCTATG-3'

プライマーU41 5'-ATGGATCCGCCCCACAAGGTCCCAAA-3'

プライマーU42 5'-ATGGATCCAATGACTCCAACACCAAG-3'

0.01 μ gのpER23-1DNAを79 μ lの蒸留水に溶解し、10 μ lの10xPCRバッファー(宝酒造社製Taq DNAポリメラーゼに添付)、8 μ lの2.5mM dNTPにプライマーU5とU7もしくはU10とU12をそれぞれ100 pmolずつ及び0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を加え最終100 μ lとし、以下の要領にてPCR反応を行なった。反応装置はパーキンエルマー社製ジーンアンプPCRシステム9600を用いた。反応条件は1) 94℃; 30秒、2) 55℃; 30秒、3) 72℃; 1分で1) 2) 3)を30回繰り返した。反応後、15 μ lを制限酵素BamHIとSalIで切断し、1%アガロースゲル電気泳動にかけた。

電気泳動に供した上記ゲルを0.5 μ g/mlの臭化エチジウム溶液で15分間染色し、UV下で観察して、想定される特異的に増幅が観察できた断片を切り出

した。同ゲル断片はジーンクリーンII（バイオ101社製）によって処理し、DNAを含む溶液を回収した。回収したDNA断片をプラスミドpMAL-c2のBamHI-SalI部位にクローニングし大腸菌DH5 α に導入した。

2) 大腸菌からの可溶化蛋白画分の調製

それぞれのプラスミドを導入した大腸菌を1晩、発現培地（10g/lトリプトン；ギブコ社製、5g/l酵母抽出物；ギブコ社製、5g/l NaCl、2g/lブドウ糖、100 μ g/mlアンピシリン）で前培養した培養液0.4mlを40mlの発現培地に添加し、OD₆₀₀=0.55になるまで37℃で振盪培養した。最終濃度0.3mMになるようにイソプロピルチオガラクトサイドを加えさらに4時間振盪培養を継続し、発現の誘導を行なった。大腸菌を遠心分離で回収後、洗浄バッファー（20mM Tris-HCl, pH7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA）で菌体を洗浄し、超音波処理（15秒ずつ2分間）で細胞を破碎し、終濃度0.25% ZW3-12添加後 30分間 4℃でインキュベート後、遠心分離（10,000 rpm, 5 min）により上清を回収し、大腸菌可溶化蛋白画分を得た。融合蛋白が発現していることは、坑マルトース結合蛋白抗体（ニューイングランドバイオラボ社製）を用いたイムノブロット法により確認した。

3) エリシター結合実験

エリシターとの結合活性は以下のようにして測定した。エリシターとチラミン（東京化成工業社製）の複合体をJong-Joo Cheong [The Plant Cell (1991) 3: 127] らの方法に従い合成した。次に、エリシターとチラミンの複合体をクロラミンTを用いてヨードラベルした。500 μ l のアッセイ用緩衝液（50mM Tris-HCl pH7.4, 0.1M Saccharose, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA）中に、得られた標品（タンパク量800 μ g以下）を懸濁し、0℃で2時間インキュベートした後、100nM ヨードラベル化エリシターチラミン複合体（70Ci/mmol）を加え、4℃で2時間インキュベートした。ワットマンGF/B（0.3%ポリエチレンイミン水溶液で1時間以上処理した）で反応溶液を濾過した後、5mlの氷冷緩衝液（10mM Tris-HCl pH7.0, 1M NaCl, 10mM MgCl₂）で3回洗浄し、膜上に残った放射活性をガンマカウンターでカウントした（カウントA）。非特異的結合による影響を除くため、同じサンプルに17 μ Mのエリシターを加えアッセイ用緩衝液に懸濁した後、0℃で2時間インキュベートし、上記と同様の操作を行ない、得られた

放射活性のカウントを上記のカウントAから差し引きすることにより、ERの特異的結合によるカウント (Δ cpm) を求めた。得られたカウント数 (Δ cpm) と、実験に用いた全カウント数の商を求め、次いで実験に用いた全エリシター量との積を求めることでエリシター結合蛋白量 (mol数) を計算した。

ERのDNAを導入した大腸菌でもエリシターとの特異的な結合が観察された (第6図)。よって、上記のようにして得られた遺伝子はエリシター結合活性を持つタンパクをコードすることが再確認できたとともに、配列番号1中の239から442のアミノ酸配列中にエリシター結合ドメインが存在することが明かとなった。

〔実施例5〕 エリシター結合ドメインの抗体によるグルカンエリシターとダイズ子葉膜画分のエリシター結合タンパクとの結合阻害とダイズ子葉のファイトアレキシン蓄積阻害

1) 大腸菌でのエリシター結合ドメインの発現

ER由来の大量のエリシター結合ドメインを大腸菌で発現させるためマルトース結合蛋白(MBP)との融合蛋白の作成をニューイングランドバイオラボ社製のProtein Fusion & Purification Systemを用いて行なった。エリシター結合ドメインをコードするDNAを得るためPCRを用いた。以下のプライマーを自動核酸合成機 (アプライドバイオシステム社モデル394) を用いて合成し用いた。

プライマーU36 5'-ATGGATCCGAATATAACTGGGAGAAG-3'

プライマーU39 5'-TAGTCGACTACTTCCTACCCCATGCTGG-3'

0.01 μ g のpER23-1DNAを79 μ lの蒸留水に溶解し、10 μ lの10x PCRバッファー (宝酒造社製Taq DNAポリメラーゼに添付)、8 μ lの2.5mM dNTPにプライマーU5とU7もしくはU10とU12をそれぞれ100 pmolずつ及び0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を加え最終100 μ lとし、以下の要領にてPCR反応を行なった。

反応装置はパーキンエルマー社製ジーンアンプPCRシステム9600を用いた。反応条件は1) 94℃; 30秒、2) 55℃; 30秒、3) 72℃; 1分で1) 2) 3) を30回繰り返した。反応後、15 μ lを制限酵素BamHIとSalIで切断し、1%アガロースゲル電気泳動にかけた。

電気泳動に供した上記ゲルを $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の臭化エチジウム溶液で15分間染色し、UV下で観察して、特異的な増幅が観察できた断片を示すバンドを切り出した。同ゲル断片はジーンクリーンII（バイオ101社製）によって処理し、DNAを含む溶液を回収した。回収したDNA断片をプラスミドpMAL-c2のBamHI-SalI部位にクローニングし大腸菌DH5 α に導入した。

2) 大腸菌で発現した融合蛋白の精製と抗体の作成

プラスミドを導入した大腸菌を1晩、発現培地（10g/lトリプトン；ギブコ社製、5g/l酵母抽出物；ギブコ社製、5g/l NaCl、2g/lブドウ糖、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン）で前培養した培養液150mlを1.5lの発現培地に添加し、 $\text{OD}_{600}=0.55$ になるまで37℃で坂口フラスコにて振盪培養した。最終濃度0.3mMになるようにイソプロピルチオガラクトサイドを加えさらに4時間振盪培養を継続し、発現の誘導を行なった。大腸菌を遠心分離で回収後、洗浄バッファー（20mM Tris-HCl, pH7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA）で菌体を洗浄し、超音波処理（15秒ずつ2分間）で細胞を破碎した。遠心によって得られた可溶化蛋白画分からMBP融合蛋白をアミロースレジンで精製、さらにファクターXaでMBPとエリシター結合ドメインを切断後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製蛋白（エリシター結合ドメイン）を得た。精製蛋白はE. Harlow とD. Lane [Antibody (1988) コールドスプリングハーバー社, pp.53-137] の方法に従い、マウス腹腔に2回免疫感作を行なった。力価が上昇したことをELISA法で確認した後、腹水を取得し、50%飽和硫酸沈殿、プロテインAセファロース（ファルマシア社製）で処理（0.1 M リン酸ナトリウム pH 8.0で抗体を結合し、0.1 M クエン酸 pH 3.5で溶出した。）して抗体の精製を行なった。イムノブロット法では、得られた抗体は、ダイズにおいてはER蛋白のみを認識することが確認された。

3) ダイズ子葉膜画分の調製

ダイズ子葉膜画分の調製は以下のように行なった。

土壌栽培（9日間）したダイズ子葉（湿重、36 g）を収穫し、47mlの氷冷バッファー（25 mM Tris-HCl pH 7.0, 30 mM MgCl_2 , 2 mM dithiothreitol, 2.5 mM sodium metabisulfite, 1 mM PMSF）に懸濁した。子葉膜画分の調製法はダイズ根の膜画分調製法に従った。得られた子葉膜画分を1mlの氷冷バッファー（10

mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA) に懸濁し-80℃で保存した。

4) ダイズ子葉膜画分のエリシター結合タンパクとグルカンエリシターの結合反応の阻害活性測定

エリシターとの結合活性は以下のようにして測定した。エリシターとチラミン（東京化成工業社製）の複合体をJong-Joo Cheong [The Plant Cell (1991) 3: 127] らの方法に従い合成した。次に、エリシターとチラミンの複合体をクロラミンTを用いてヨードラベルした。500 μ l のアッセイ用緩衝液（50mM Tris-HCl pH7.4, 0.1M Saccharose, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA)中に、ダイズ子葉膜画分（100 μ l, 820 μ g）を懸濁し、0℃で2時間インキュベートした後、714ng(143 nM)のヨードラベル化エリシターチラミン複合体（70Ci/mmol）を加え、4℃で2時間インキュベートした。ワットマンGF/B（0.3%ポリエチレンイミン水溶液で1時間以上処理した）で反応溶液を濾過した後、5mlの氷冷緩衝液（10mM Tris-HCl pH7.0, 1M NaCl, 10mM MgCl₂）で3回洗浄し、膜上に残った放射活性をガンマカウンターでカウントした（カウントA）。非特異的結合による影響を除くため、同じサンプルに約100倍量（75 μ g, 15 μ M）のコールドエリシターを加えアッセイ用緩衝液に懸濁した後、0℃で2時間インキュベートし、上記と同様の操作を行ない、得られた放射活性のカウントを上記のカウントAから差し引きすることにより得られた、ERの特異的結合によるカウント（ Δ cpm）を100%として、コールドエリシターの代わりにそれぞれ3.6、7.1、10.8、14.4、28.8 μ gの精製抗体を加えインキュベートして得られた結合カウント数をカウントAから差し引いて得られる値を求め、コールドエリシターで得られたカウント数との比較をパーセントで表した（第7図）。28.8 μ gの抗体で51%程エリシターの結合が阻害された。この結果によって、エリシター結合ドメインの抗体が確かにエリシターとエリシター結合タンパクとの結合を阻害しうることが確認できた。

5) エリシター結合ドメインの抗体によるファイトアレキシン蓄積阻害

ダイズ子葉を用いたグルカンエリシターによるファイトアレキシン蓄積量の測定はM. G. Hahnらの[(1992) Molecular Plant Pathology Volume 11 A

Practical Approach, IRL Press pp. 117-120]方法にしたがった。

エリシター結合ドメインに対する精製抗体それぞれ(0、1、2、3、4、10、 $20\mu\text{g}/25\mu\text{l}$ /子葉1枚)及び対照として酵母由来のdsRNAaseであるpac 1に対する精製抗体それぞれ(4、10、 $20\mu\text{g}/25\mu\text{l}$ /子葉1枚)をダイズ子葉に加え、1時間インキュベートした後、グルカンエリシター($200\text{ng}/25\mu\text{l}$ /子葉1枚)を更にダイズ子葉に加え20時間インキュベートしてグルカンエリシターによるファイトアレキシン蓄積が抗体によって阻害されるかを調べた。エリシター単独で蓄積されるファイトアレキシン量を100%として、抗体を添加した後エリシターを添加することによって誘導蓄積されるファイトアレキシン量をパーセントで表した(第8図)。ダイズ子葉1枚当たり $20.0\mu\text{g}$ のエリシター結合ドメインに対する抗体を加えた場合、約53%ファイトアレキシンの蓄積量が減少したが、対照のpac 1抗体ではダイズ子葉1枚当たり $20.0\mu\text{g}$ を加えてもファイトアレキシンの蓄積量はほとんど変化しなかった。これらの結果から、取得された遺伝子は単なるエリシター結合蛋白ではなく、ダイズの抵抗性反応を引き起こすERをコードしていることが示された。

産業上の利用可能性

本発明により、グルカンエリシターレセプター、それをコードするDNAおよびその断片、該DNAおよびその断片を含むベクター、並びに、該DNAおよびその断片が導入された植物細胞が提供された。

本発明のERは、カビに対する耐病性の機構解明やカビ耐性を誘導するエリシターの誘導体の開発に、また、ERに対する抗体を調製するための抗原として有用である。

また、本発明のグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAおよびその断片は、カビ耐性植物の育種技術の確立のための材料として有用である。すなわち、本発明のDNAまたはその断片を、種々の植物に導入し発現させれば、その植物のカビに対する抵抗性を高めることが出来る。

さらに、本発明のグルカンエリシターレセプターに対する抗体や、本発明のグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNA、その変異体及

びこれらのDNAに対するアンチセンスDNAは、ERのエリシター結合部位やシグナル伝達の研究に用いることができる。

さらにまた、ERのアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列の情報はERに対するエリシターの結合部位やERの関与するシグナル伝達に関する研究に利用することができる。

配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 6 6 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val	Asn	Ile	Gln	Thr	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ile	Phe	Pro	Gln	Thr	Gln	Ser	Thr	Val
1				5					10					15			
Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Lys	Phe	Phe	Ser	Ser	Asn	Leu	Leu	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro
	20					25				30					35		
Thr	Asn	Ser	Phe	Phe	Gln	Asn	Phe	Val	Leu	Lys	Asn	Gly	Asp	Gln	Gln	Glu	Tyr
			40					45					50				
Ile	His	Pro	Tyr	Leu	Ile	Lys	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Pro
55					60				65						70		
Ser	Arg	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Ile	Phe	Gln	Val	Phe	Asn	Pro	Asp	Leu	Thr
	75						80				85					90	
Ile	Ser	Ala	Pro	Gln	Gly	Pro	Lys	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	His	Leu	Ile	Ser
				95					100					105			
Ser	Tyr	Ser	Asp	Leu	Ser	Val	Thr	Leu	Asp	Phe	Pro	Ser	Ser	Asn	Leu	Ser	Phe
	110					115				120						125	
Phe	Leu	Val	Arg	Gly	Ser	Pro	Tyr	Leu	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro
			130					135					140				
Leu	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	His	Ser	Ile	Leu	Ser	Phe	Ser	Ser	Asn	Asp	Ser	Asn
145					150				155					160			
Thr	Lys	Tyr	Thr	Phe	Gln	Phe	Asn	Asn	Gly	Gln	Thr	Trp	Leu	Leu	Tyr	Ala	Thr
	165						170				175					180	
Ser	Pro	Ile	Lys	Leu	Asn	His	Thr	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Ser	Asn	Ala	Phe	Ser
				185					190					195			

Gly Ile Ile Arg Ile Ala Leu Leu Pro Asp Ser Asp Ser Lys His Glu Ala Val
 200 205 210 215
 Leu Asp Lys Tyr Ser Ser Cys Tyr Pro Val Ser Gly Lys Ala Val Phe Arg Glu
 220 225 230
 Pro Phe Cys Val Glu Tyr Asn Trp Glu Lys Lys Asp Ser Gly Asp Leu Leu Leu
 235 240 245 250
 Leu Ala His Pro Leu His Val Gln Leu Leu Arg Asn Gly Asp Asn Asp Val Lys
 255 260 265 270
 Ile Leu Glu Asp Leu Lys Tyr Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val
 275 280 285
 Gly Asp Ser Trp Val Leu Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile
 290 295 300 305
 Lys Gly Ile Lys Glu Glu Ser His Asp Glu Ile Val Ser Ala Leu Ser Lys Asp
 310 315 320
 Val Glu Ser Leu Asp Ser Ser Ser Ile Thr Thr Thr Glu Ser Tyr Phe Tyr Gly
 325 330 335 340
 Lys Leu Ile Ala Arg Ala Ala Arg Leu Val Leu Ile Ala Glu Glu Leu Asn Tyr
 345 350 355 360
 Pro Asp Val Ile Pro Lys Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Thr Ile Glu Pro Trp
 365 370 375
 Leu Glu Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gly Phe Leu His Asp Glu Lys Trp Gly Gly
 380 385 390 395
 Ile Ile Thr Gln Lys Gly Ser Thr Asp Ala Gly Gly Asp Phe Gly Phe Gly Ile
 400 405 410
 Tyr Asn Asp His His Tyr His Leu Gly Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Ala Val Leu
 415 420 425 430
 Thr Lys Leu Asp Pro Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile
 435 440 445 450
 Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp Thr Lys Leu Asn Ser Asn Tyr Thr Arg Leu

455 460 465
 Arg Cys Phe Asp Pro Tyr Val Leu His Ser Trp Ala Gly Gly Leu Thr Glu Phe
 470 475 480 485
 Thr Asp Gly Arg Asn Gln Glu Ser Thr Ser Glu Ala Val Ser Ala Tyr Tyr Ser
 490 495 500
 Ala Ala Leu Met Gly Leu Ala Tyr Gly Asp Ala Pro Leu Val Ala Leu Gly Ser
 505 510 515 520
 Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ile Glu Gly Thr Lys Met Trp Trp His Val Lys Glu
 525 530 535 540
 Gly Gly Thr Leu Tyr Glu Lys Glu Phe Thr Gln Glu Asn Arg Val Met Gly Val
 545 550 555
 Leu Trp Ser Asn Lys Arg Asp Thr Gly Leu Trp Phe Ala Pro Ala Glu Trp Lys
 560 565 570 575
 Glu Cys Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Leu Ala Pro Ile Ser Glu Ala Ile
 580 585 590
 Phe Ser Asn Val Asp Phe Val Lys Glu Leu Val Glu Trp Thr Leu Pro Ala Leu
 595 600 605 610
 Asp Arg Glu Gly Gly Val Gly Glu Gly Trp Lys Gly Phe Val Tyr Ala Leu Glu
 615 620 625 630
 Gly Val Tyr Asp Asn Glu Ser Ala Leu Gln Lys Ile Arg Asn Leu Lys Gly Phe
 635 640 645
 Asp Gly Gly Asn Ser Leu Thr Asn Leu Leu Trp Trp Ile His Ser Arg Ser Asp
 650 655 660 665
 Glu
 667

配列番号 : 2

配列の長さ : 2 0 0 4

配列の型 : 核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ダイズ (Glycine max L.)

株名：グリーンホーマー

配列

9	18	27	36	45	54
GTT AAC ATC CAA ACC AAT ACA TCT TAC ATC TTC CCT CAA ACA CAA TCC ACT GTT					
Val Asn Ile Gln Thr Asn Thr Ser Tyr Ile Phe Pro Gln Thr Gln Ser Thr Val					
63	72	81	90	99	108
CTT CCT GAT CCC TCC AAA TTC TTC TCC TCA AAC CTT CTC TCA AGT CCA CTC CCC					
Leu Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Ser Asn Leu Leu Ser Ser Pro Leu Pro					
117	126	135	144	153	162
ACA AAC TCT TTC TTC CAA AAC TTT GTC CTA AAA AAT GGT GAC CAA CAA GAA TAC					
Thr Asn Ser Phe Phe Gln Asn Phe Val Leu Lys Asn Gly Asp Gln Gln Glu Tyr					
171	180	189	198	207	216
ATT CAT CCT TAC CTC ATC AAA TCC TCC AAC TCT TCC CTC TCT CTC TCA TAC CCT					
Ile His Pro Tyr Leu Ile Lys Ser Ser Asn Ser Ser Leu Ser Leu Ser Tyr Pro					
225	234	243	252	261	270
TCT CGC CAA GCC AGT TCA GCT GTC ATA TTC CAA GTC TTC AAT CCT GAT CTT ACC					
Ser Arg Gln Ala Ser Ser Ala Val Ile Phe Gln Val Phe Asn Pro Asp Leu Thr					
279	288	297	306	315	324
ATT TCA GCC CCA CAA GGT CCC AAA CAA GGT CCC CCT GGT AAA CAC CTT ATC TCC					

Ile Ser Ala Pro Gln Gly Pro Lys Gln Gly Pro Pro Gly Lys His Leu Ile Ser

333 342 351 360 369 378
TCC TAC AGT GAT CTC AGT GTC ACC TTG GAT TTC CCT TCT TCC AAT CTG AGC TTC
Ser Tyr Ser Asp Leu Ser Val Thr Leu Asp Phe Pro Ser Ser Asn Leu Ser Phe

387 396 405 414 423 432
TTC CTT GTT AGG GGA AGC CCC TAT TTG ACT GTG TCT GTG ACT CAA CCA ACT CCT
Phe Leu Val Arg Gly Ser Pro Tyr Leu Thr Val Ser Val Thr Gln Pro Thr Pro

441 450 459 468 477 486
CTT TCA ATT ACC ACC ATC CAT TCC ATT CTC TCA TTC TCT TCA AAT GAC TCC AAC
Leu Ser Ile Thr Thr Ile His Ser Ile Leu Ser Phe Ser Ser Asn Asp Ser Asn

495 504 513 522 531 540
ACC AAG TAC ACC TTT CAG TTC AAC AAT GGT CAA ACA TGG CTT CTT TAT GCT ACC
Thr Lys Tyr Thr Phe Gln Phe Asn Asn Gly Gln Thr Trp Leu Leu Tyr Ala Thr

549 558 567 576 585 594
TCC CCC ATC AAG TTG AAC CAC ACC CTT TCT GAG ATA ACT TCT AAT GCA TTT TCT
Ser Pro Ile Lys Leu Asn His Thr Leu Ser Glu Ile Thr Ser Asn Ala Phe Ser

603 612 621 630 639 648
GGC ATA ATC CGG ATA GCT TTG TTG CCG GAT TCG GAT TCG AAA CAC GAG GCT GTT
Gly Ile Ile Arg Ile Ala Leu Leu Pro Asp Ser Asp Ser Lys His Glu Ala Val

657 666 675 684 693 702
CTT GAC AAG TAT AGT TCT TGT TAC CCC GTG TCA GGT AAA GCT GTG TTC AGA GAA
Leu Asp Lys Tyr Ser Ser Cys Tyr Pro Val Ser Gly Lys Ala Val Phe Arg Glu

711 720 729 738 747 756
CCT TTC TGT GTG GAA TAT AAC TGG GAG AAG AAA GAT TCA GGG GAT TTG CTA CTC
Pro Phe Cys Val Glu Tyr Asn Trp Glu Lys Lys Asp Ser Gly Asp Leu Leu Leu

765 774 783 792 801 810
TTG GCT CAC CCT CTC CAT GTT CAG CTT CTT CGT AAT GGA GAC AAT GAT GTC AAA
Leu Ala His Pro Leu His Val Gln Leu Leu Arg Asn Gly Asp Asn Asp Val Lys

819 828 837 846 855 864
ATT CTT GAA GAT TTA AAG TAT AAA AGC ATT GAT GGG GAT CTT GTT GGT GTT GTC
Ile Leu Glu Asp Leu Lys Tyr Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val

873 882 891 900 909 918
GGG GAT TCA TGG GTT TTG AAA ACA GAT CCT TTG TTT GTA ACA TGG CAT TCA ATC
Gly Asp Ser Trp Val Leu Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile

927 936 945 954 963 972
AAG GGA ATC AAA GAA GAA TCC CAT GAT GAG ATT GTC TCA GCC CTT TCT AAA GAT
Lys Gly Ile Lys Glu Glu Ser His Asp Glu Ile Val Ser Ala Leu Ser Lys Asp

981 990 999 1008 1017 1026
GTT GAG AGC CTA GAT TCA TCA TCA ATA ACT ACA ACA GAG TCA TAT TTT TAT GGG
Val Glu Ser Leu Asp Ser Ser Ser Ile Thr Thr Thr Glu Ser Tyr Phe Tyr Gly

1035 1044 1053 1062 1071 1080
AAG TTG ATT GCA AGG GCT GCA AGG TTG GTA TTG ATT GCT GAG GAG TTG AAC TAC
Lys Leu Ile Ala Arg Ala Ala Arg Leu Val Leu Ile Ala Glu Glu Leu Asn Tyr

1089 1098 1107 1116 1125 1134

CCT GAT GTG ATT CCA AAG GTT AGG AAT TTT TTG AAA GAA ACC ATT GAG CCA TGG
Pro Asp Val Ile Pro Lys Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Thr Ile Glu Pro Trp

1143 1152 1161 1170 1179 1188
TTG GAG GGA ACT TTT AGT GGG AAT GGA TTC CTA CAT GAT GAA AAA TGG GGT GGC
Leu Glu Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gly Phe Leu His Asp Glu Lys Trp Gly Gly

1197 1206 1215 1224 1233 1242
ATT ATT ACC CAA AAG GGG TCC ACT GAT GCT GGT GGT GAT TTT GGA TTT GGA ATT
Ile Ile Thr Gln Lys Gly Ser Thr Asp Ala Gly Gly Asp Phe Gly Phe Gly Ile

1251 1260 1269 1278 1287 1296
TAC AAT GAT CAC CAC TAT CAT TTG GGG TAC TTC ATT TAT GGA ATT GCG GTG CTC
Tyr Asn Asp His His Tyr His Leu Gly Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Ala Val Leu

1305 1314 1323 1332 1341 1350
ACT AAG CTT GAT CCA GCA TGG GGT AGG AAG TAC AAG CCT CAA GCC TAT TCA ATA
Thr Lys Leu Asp Pro Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile

1359 1368 1377 1386 1395 1404
GTG CAA GAC TTC TTG AAC TTG GAC ACA AAA TTA AAC TCC AAT TAC ACA CGT TTG
Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp Thr Lys Leu Asn Ser Asn Tyr Thr Arg Leu

1413 1422 1431 1440 1449 1458
AGG TGT TTT GAC CCT TAT GTG CTT CAC TCT TGG GCT GGA GGG TTA ACT GAG TTC
Arg Cys Phe Asp Pro Tyr Val Leu His Ser Trp Ala Gly Gly Leu Thr Glu Phe

1467 1476 1485 1494 1503 1512
ACA GAT GGA AGG AAT CAA GAG AGC ACA AGT GAG GCT GTG AGT GCA TAT TAT TCT

Thr Asp Gly Arg Asn Gln Glu Ser Thr Ser Glu Ala Val Ser Ala Tyr Tyr Ser

1521 1530 1539 1548 1557 1566
GCT GCT TTG ATG GGA TTA GCA TAT GGT GAT GCA CCT CTT GTT GCA CTT GGA TCA
Ala Ala Leu Met Gly Leu Ala Tyr Gly Asp Ala Pro Leu Val Ala Leu Gly Ser

1575 1584 1593 1602 1611 1620
ACA CTC ACA GCA TTG GAA ATT GAA GGG ACT AAA ATG TGG TGG CAT GTG AAA GAG
Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ile Glu Gly Thr Lys Met Trp Trp His Val Lys Glu

1629 1638 1647 1656 1665 1674
GGA GGT ACT TTG TAT GAG AAA GAG TTT ACA CAA GAG AAT AGG GTG ATG GGT GTT
Gly Gly Thr Leu Tyr Glu Lys Glu Phe Thr Gln Glu Asn Arg Val Met Gly Val

1683 1692 1701 1710 1719 1728
CTA TGG TCT AAC AAG AGG GAC ACT GGA CTT TGG TTT GCT CCT GCT GAG TGG AAA
Leu Trp Ser Asn Lys Arg Asp Thr Gly Leu Trp Phe Ala Pro Ala Glu Trp Lys

1737 1746 1755 1764 1773 1782
GAG TGT AGG CTT GGC ATT CAG CTC TTA CCA TTG GCT CCT ATT TCT GAA GCC ATT
Glu Cys Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Leu Ala Pro Ile Ser Glu Ala Ile

1791 1800 1809 1818 1827 1836
TTC TCC AAT GTT GAC TTT GTA AAG GAG CTT GTG GAG TGG ACT TTG CCT GCT TTG
Phe Ser Asn Val Asp Phe Val Lys Glu Leu Val Glu Trp Thr Leu Pro Ala Leu

1845 1854 1863 1872 1881 1890
GAT AGG GAG GGT GGT GTT GGT GAA GGA TGG AAG GGG TTT GTG TAT GCC CTT GAA
Asp Arg Glu Gly Gly Val Gly Glu Gly Trp Lys Gly Phe Val Tyr Ala Leu Glu

1899 1908 1917 1926 1935 1944
GGG GTT TAT GAC AAT GAA AGT GCA CTG CAG AAG ATA AGA AAC CTG AAA GGT TTT
Gly Val Tyr Asp Asn Glu Ser Ala Leu Gln Lys Ile Arg Asn Leu Lys Gly Phe

1953 1962 1971 1980 1989 1998
GAT GGT GGA AAC TCT TTG ACC AAT CTC TTG TGG TGG ATT CAT AGC AGA AGT GAT
Asp Gly Gly Asn Ser Leu Thr Asn Leu Leu Trp Trp Ile His Ser Arg Ser Asp

2004
GAA TAG
Glu

配列番号 : 3

配列の長さ : 5 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GGAATTCGAG CTCGGTACCC GGGGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGGCA TGCA

配列番号 : 4

配列の長さ : 5 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

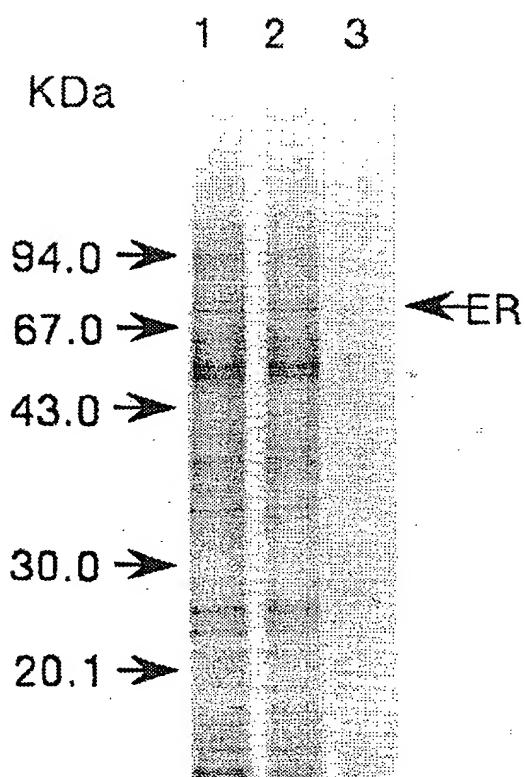
CCTTAAGCTC GAGCCATGGG CCCCCTAGGA GATCTCAGCT GGACGTCCGT ACGTTCGA

請 求 の 範 囲

1. 実質的に配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプター。
2. 実質的に配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含む DNA またはその断片。
3. グルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列が配列表の配列番号 2 に示すものである、請求項 2 記載の DNA またはその断片。
4. プラスミド pER23-1 に組み込まれ、グルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含む DNA またはその断片。
5. 請求の範囲第 2 項～第 4 項のいずれかに記載の DNA またはその断片を含むベクター。
6. 請求の範囲第 2 項～第 4 項のいずれかに記載の DNA またはその断片が導入された植物細胞。

第 1 図

図1 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動



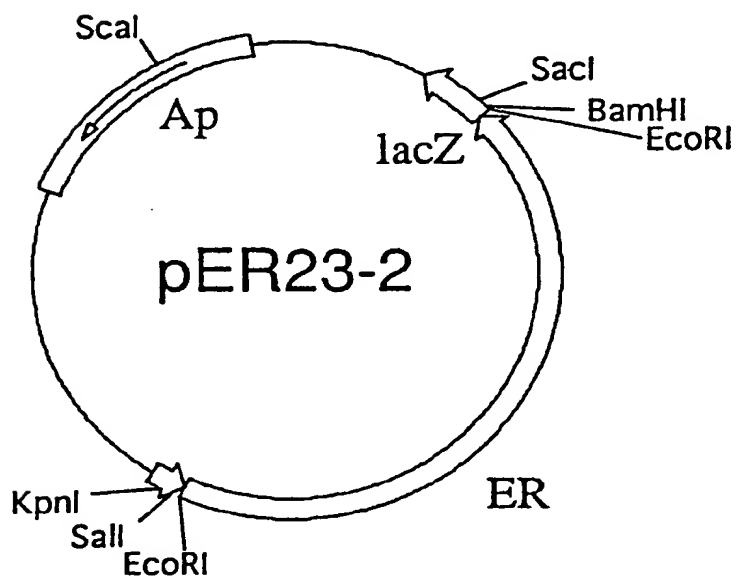
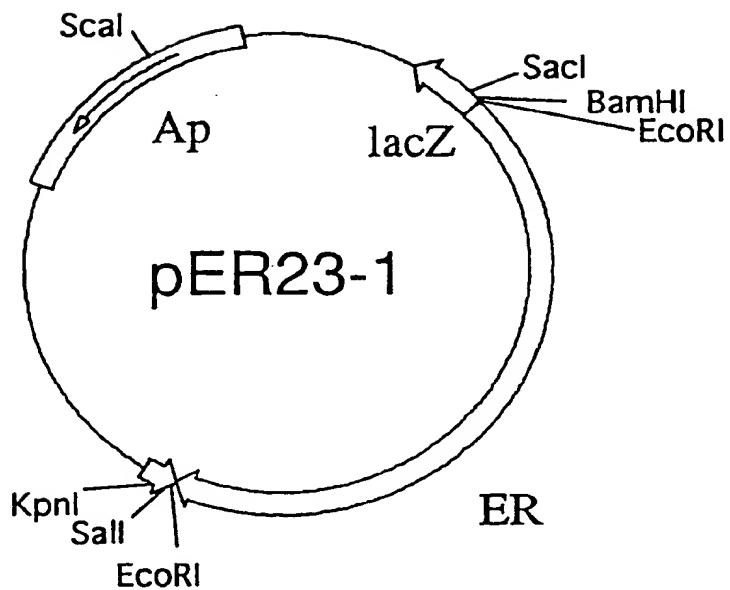
1: Momo Q活性画分

2: マルトース結合ガラスゲル素通り画分

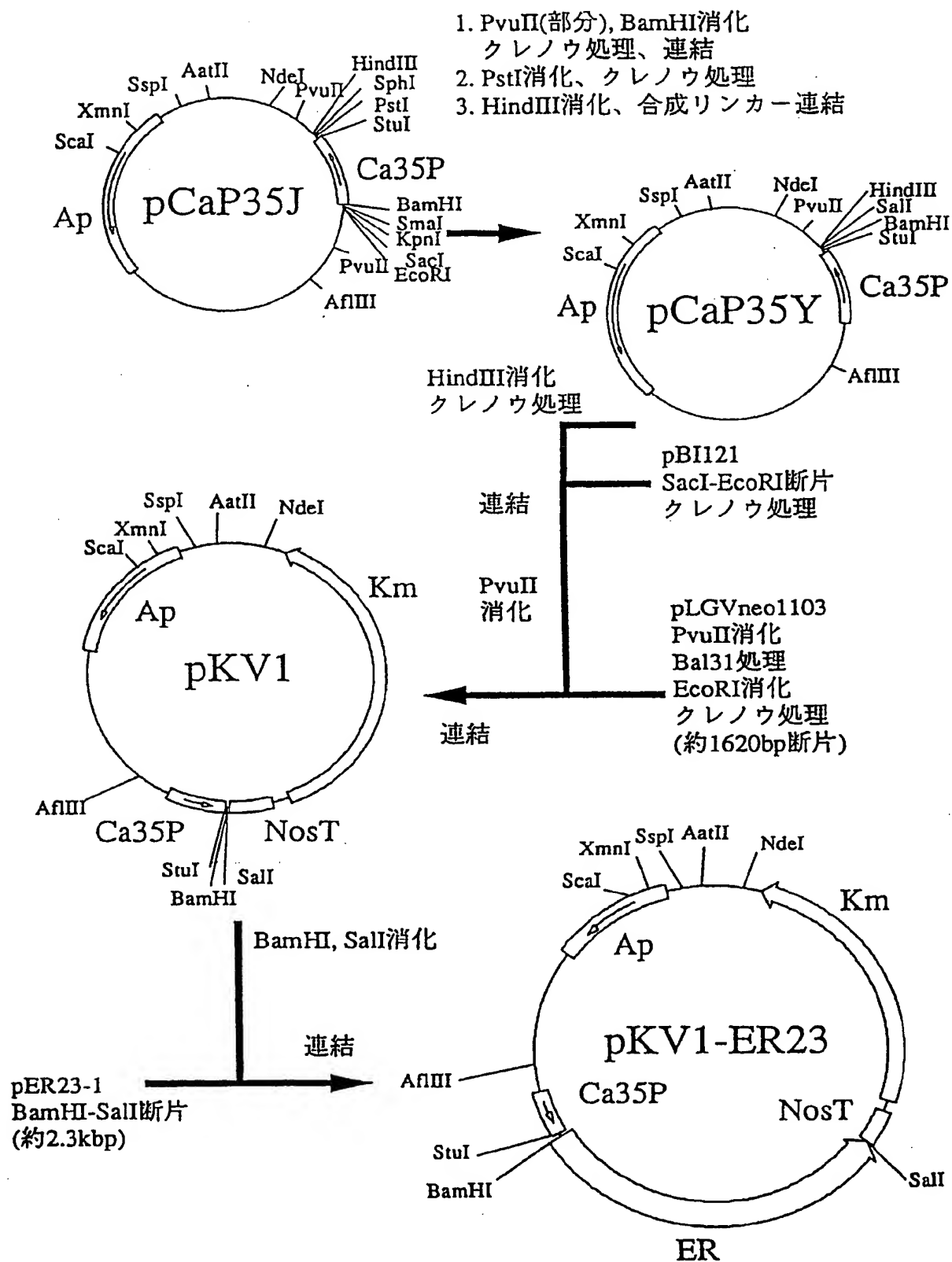
3: エリシター結合ガラスゲル溶出画分

ER: エリシターレセプター

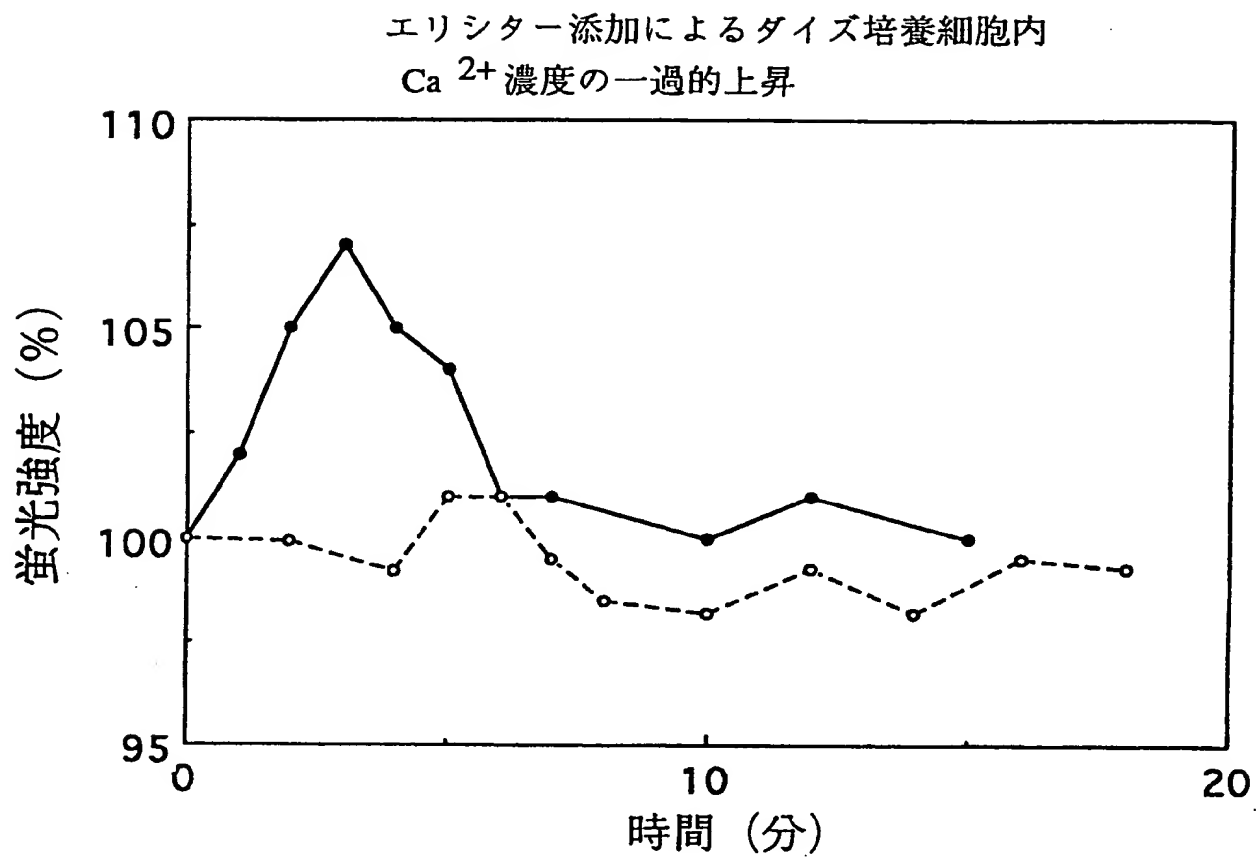
第 2 図



第 3 図



第 4 図



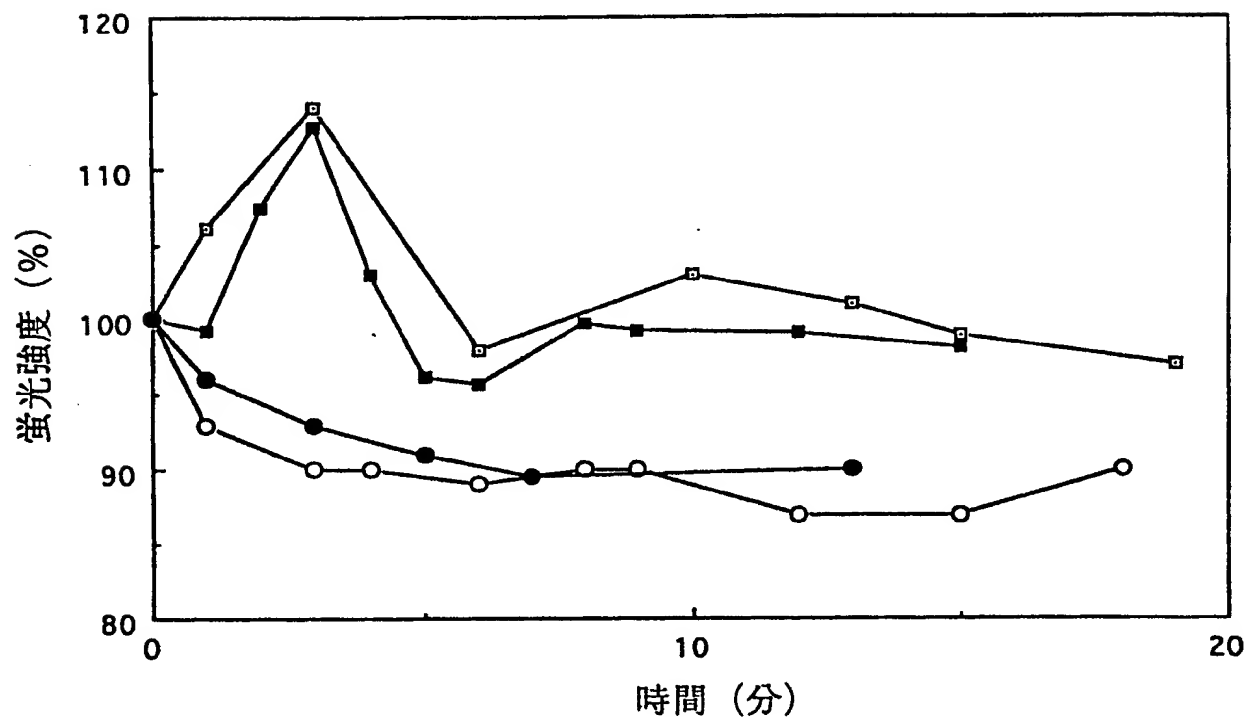
蛍光強度 (%) : (サンプル添加後の蛍光強度 / サンプル添加前の蛍光強度) X 100

—●— : ダイズ培養細胞にエリシターを添加

---○--- : ダイズ培養細胞に脱イオン水を添加

第 5 図

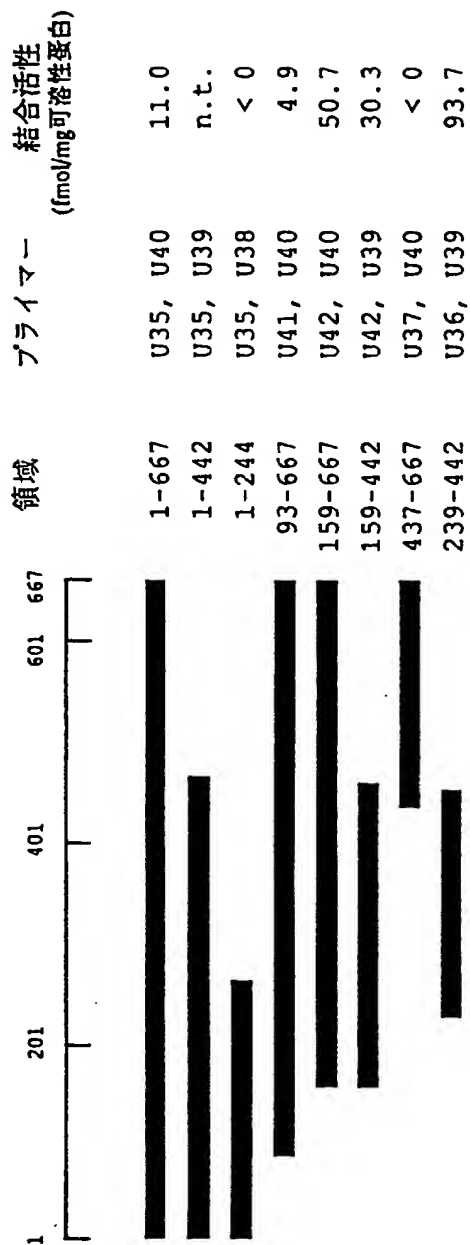
エリシター添加による形質転換タバコ培養細胞内
Ca²⁺ 濃度の一過的上昇



蛍光強度 (%) : (サンプル添加後の蛍光強度 / サンプル添加前の蛍光強度) X 100

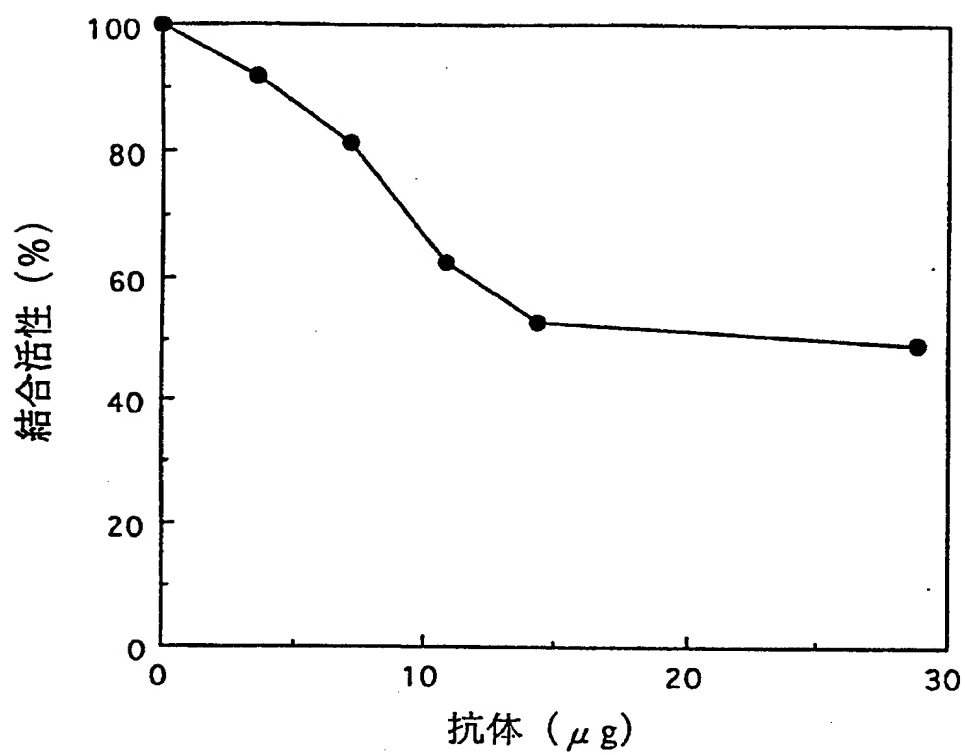
- : エリシター添加、形質転換タバコ培養細胞
- : エリシター添加、形質転換タバコ培養細胞
- : 脱イオン水添加、形質転換タバコ培養細胞
- : エリシター添加、プラスミド導入タバコ培養細胞

第 6 図



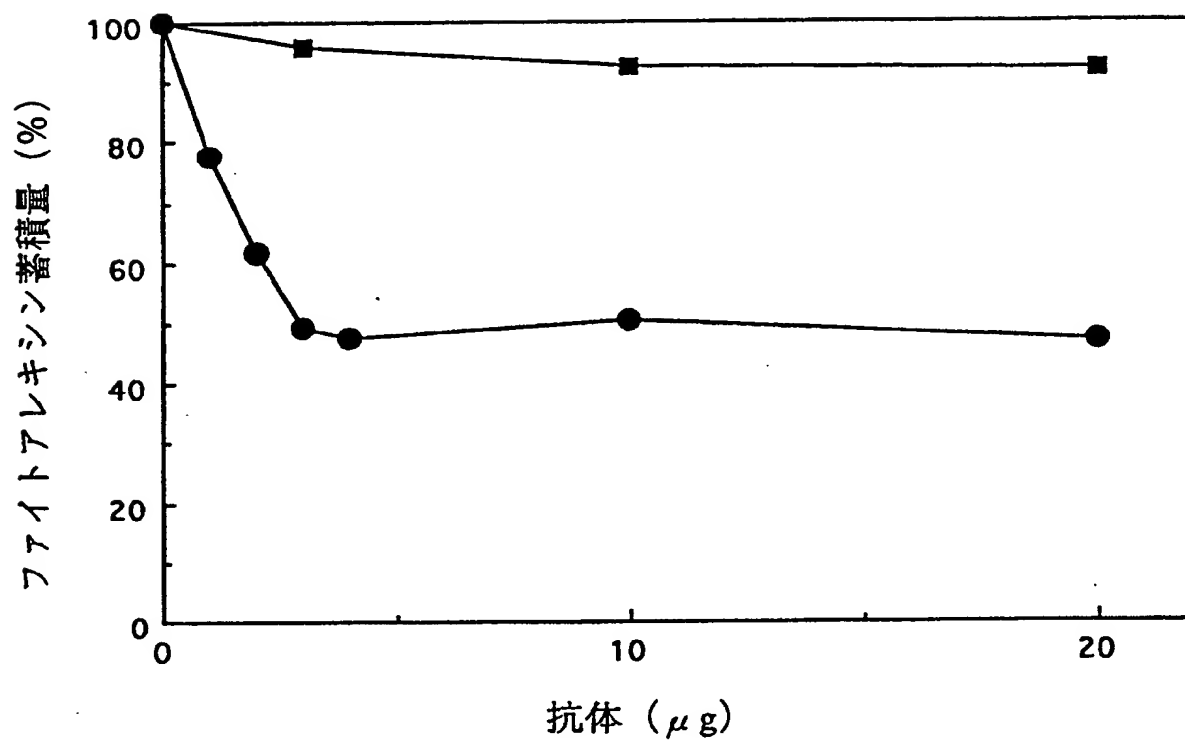
第 7 図

抗体によるエリシターと膜画分との結合阻害



第 8 図

抗体によるエリシターのファイトアレキシン蓄積阻害



—■— : 酵母由来のpac Iに対する抗体を添加

—●— : エリシター結合ドメインに対する抗体を添加

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/12, C07K14/705, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/12, C07K14/705, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JP, 6-321995, A (Kirin Brewery Co., Ltd.), November 22, 1994 (22. 11. 94) (Family: none)	1 - 6
A	Frey, T. et al. "Affinity purification and characterization of a binding protein for a hepta-beta glucoside phytoalexin elicitor in soybean" Phytochemistry (1993) Vol. 32, No. 3, p. 543-550	1 - 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 5, 1995 (05. 09. 95)

Date of mailing of the international search report

September 26, 1995 (26. 09. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/12, C07K14/705, C12N5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/12, C07K14/705, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE,
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 6-321995, A (麒麟麦酒株式会社), 22. 11月. 1994 (22. 11. 94) (ファミリーなし)	1-6
A	Frey, T. et al. [Affinity purification and characterization of a binding protein for a hepta-beta glucoside phytoalexin elicitor in soybean] Phytochemistry (1993) 第32巻, 第3号 p. 543-550	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 09. 95

国際調査報告の発送日

26. 09. 95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 堀 栄 二

4 B 9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線

3 4 4 9

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)



(11) **EP 0 727 488 A1**

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**
published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:
21.08.1996 Bulletin 1996/34

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/12**, **C07K 14/705**,
C12N 5/10

(21) Application number: **95921978.3**

(86) International application number:
PCT/JP95/01206

(22) Date of filing: **16.06.1995**

(87) International publication number:
WO 95/35371 (28.12.1995 Gazette 1995/55)

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL
PT SE

(30) Priority: **17.06.1994 JP 136100/94**

(71) Applicant: **KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA**
Chuo-Ku, Tokyo 104 (JP)

(72) Inventors:
• **YOSHIKAWA, Masaaki +di**
• **(JP)**
• **KAKITANI, Makoto**
Kirin Beer K. K.
Kiban Gijutsu
Yokohama-shi Kanagawa 236 (JP)

• **UMEMOTO, Naoyuki**
Kirin Beer K. K. Kiban Gijutsu
Yokohama-shi Kanagawa 236 (JP)
• **ISHIDA, Isao**
Kirin Beer K. K. Kiban Gijutsu
Yokohama-shi Kanagawa 236 (JP)
• **IWAMATSU, Akihiro**
Kirin Beer K. K. Kiban Gijutsu
Yokohama-shi Kanagawa 236 (JP)

(74) Representative: **Kolb, Helga, Dr. Dipl.-Chem. et al**
Hoffmann, Eitle & Partner,
Patent-und Rechtsanwälte,
Arabellastrasse 4
81925 München (DE)

(54) **GLUCAN ELICITOR RECEPTOR AND DNA CODING FOR THE SAME**

(57) A glucan elicitor receptor having substantially the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing; a DNA or a fragment thereof containing a base sequence coding for the glucan elicitor receptor having substantially the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing; a DNA or a fragment thereof integrated into plasmid pER 23-1 and containing a base sequence coding for the glucan elicitor receptor; a vector containing the DNA or the fragment thereof; and a plant cell containing the DNA or the fragment thereof incorporated thereinto.

EP 0 727 488 A1

Description

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to glucan elicitor receptor (hereinafter sometimes referred to as "ER"), DNA molecules coding for ER, vectors containing the DNA molecules and plant cells transformed with the DNA molecules. The present invention relates more specifically to ER derived from a soybean root plasma membrane fraction, DNA molecules coding for ER, vectors containing the DNA molecules and plant cells transformed with the DNA molecules.

BACKGROUND ART

It is known that plants synthesize and accumulate an antibiotic agent called phytoalexin in response to infection with pathogens (M. Yoshikawa (1978) Nature 257: 546). Some plant pathogens were found to have the substances that induce them to perform such a resistance reaction (N.T. Keen (1975) Science 187: 74), which are called "elicitors". The biochemical process from the infection of plants with pathogens to the synthesis and accumulation of phytoalexin is believed to be as follows:

When the mycelium of a pathogen invades a plant cell, glucanase in the plant cell works so as to cleave polysaccharides on the surface of the pathogen mycelial wall, thereby liberating an elicitor. If the elicitor binds to a receptor in the plant cell, a second messenger which plays a role in signal transduction is produced. The signal transduction substance is incorporated in the nucleus of the plant cell and activates the transcription of the genes coding for phytoalexin synthetase enzymes to induce a phytoalexin synthesis. At the same time, the phytoalexin degradation is inhibited. As a result, phytoalexin is efficiently accumulated.

Phytoalexin playing an important role in the resistance of soybean is called glyceollin and its structure has been determined (M. Yoshikawa et al. (1978) Physiol. Plant. Pathol. 12: 73). Elicitor is a polysaccharide of glucose and reported to be a glucan having β -1,6 and β -1,3 linkages (J.K. Sharp et al. (1984) J. Biol. Chem. 259: 11321, M. Yoshikawa (1990) Plant Cell Technology 1.2: 695). A specific receptor for glucan elicitor derived from a soybean pathogenic mold fungus *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* is believed to be a protein which plays an important role in the synthesis and accumulation of the antibiotic agent glyceollin. The method for the purification of the ER specific to this elicitor has been disclosed (E.G. Cosio et al., (1990) FEBS 264: 235, E.G. Cosio et al. (1992) Eur. J. Biochem. 204: 1115, T.Frey et al. (1993) Phytochemistry 32: 543). However, the amino acid sequence of the ER has not been determined and the gene coding therefor is not yet known.

An object of the present invention is to provide a glucan elicitor receptor.

Another object of the present invention is to provide DNA molecules coding for the glucan elicitor receptor.

A further object of the present invention is to provide vectors containing DNA molecules coding for the glucan elicitor receptor.

A still further object of the present invention is to provide plant cells transformed with DNA molecules coding for the glucan elicitor receptor.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

As a result of the various studies conducted to solve the above problems, the inventors succeeded in purifying a soybean root-derived ER and cloning the ER gene from a soybean cDNA library, thereby accomplishing the present invention. The present invention provides a glucan elicitor receptor having an amino acid sequence as substantially shown in SEQ ID NO:1. The present invention also provides DNA molecules containing nucleotide sequences coding for a glucan elicitor receptor having an amino acid sequence as substantially shown in SEQ ID NO:1, and fragments thereof. The present invention further provides DNA molecules containing nucleotide sequences coding for the glucan elicitor receptor which are incorporated in plasmid pER23-1, and fragments thereof. The present invention still further provides vectors containing DNA molecules coding for the glucan elicitor receptor and plant cells transformed with DNA molecules coding for the glucan elicitor receptor.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of three purification steps.

Figure 2 shows the maps of plasmids pER23-1 and pER23-2.

Figure 3 shows the procedure for constructing plasmid pKV1-ER23.

Figure 4 shows a transient increase in intracellular Ca^{2+} concentration after the addition of an elicitor to cultured soybean cells.

Figure 5 shows a transient increase in intracellular Ca^{2+} concentration after the addition of an elicitor to transformed cultured tobacco cells.

Figure 6 shows elicitor-binding activities of full- or partial length ER expressed in *E. coli*.

Figure 7 shows the inhibition of the binding of an elicitor with an elicitor binding protein in a soybean cotyledon membrane fraction by an antibody against an elicitor-binding domain.

Figure 8 shows the inhibition of an elicitor-induced phytoalexin accumulation in soybean cotyledons by an antibody against an elicitor-binding domain.

PREFERRED EMBODIMENTS OF CARRYING OUT THE INVENTION

The glucan elicitor receptor of the present invention is a protein having a function as a receptor for glucan elicitors derived from plant pathogens, particularly *Phytophthora*. More specifically, it is a protein which binds to the glucan elicitor produced by the cleavage of parts of the pathogen mycelial wall with β -1,3-glucanase in plant cells at the time of invasion of plant pathogens, particularly microorganisms belonging to genus *Phytophthora* and which subsequently orders the microsomes and nucleus to produce an increased amount of phytoalexin in the plant cells. The glucan elicitor receptor of the present invention have an amino acid sequence as substantially shown in SEQ ID NO:1. The "amino acid sequence as substantially shown in SEQ ID NO:1" includes amino acid sequences as shown in SEQ ID NO: 1 in which there may be the deletion, replacement or addition of an amino acid(s), provided that they maintain the function of a glucan elicitor receptor.

The glucan elicitor receptor of the present invention can be produced, for example, by a partially modified Cosio's method (E.J.B. (1992) 204: 1115). Briefly, the roots, leaves and stems of soybean, preferably variety green homer are homogenized and a membrane fraction is collected from the resulting slurry, purified by ion-exchange chromatography and further purified by affinity chromatography using an elicitor as a ligand. The elicitor used in the affinity chromatography is preferably derived from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* race 1 (ATCC34566) because it shows incompatibility for green homer (i.e., resistance to the pathogen).

The amino acid sequence of the glucan elicitor receptor thus prepared can be determined as follows:

The purified ER is transferred on a PVDF membrane (Millipore Co.) by electroblotting and digested with lysylendopeptidase (AP-I). The fragmented peptides are recovered from the PVDF membrane and fractionated by reversed-phase HPLC (μ -Bondasphere 5 μ C8). The peak fractions are analyzed with a gas-phase protein sequencer (Applied Biosystems Co.).

The ER of the present invention is useful in the elucidation of resistance mechanism of plants to fungi and the development of elicitor derivatives capable of inducing resistance to fungi, and it can be used as an antigen for the production of antibodies against ERs.

The present invention encompasses DNA molecules containing nucleotide sequences coding for a glucan elicitor receptor, and fragments thereof. The DNA molecules of the present invention have preferably at least one stop codon (e.g., TAG) adjacent to the 3' end.

More specifically, the present invention encompasses DNA molecules containing nucleotide sequences coding for a glucan elicitor receptor having an amino acid sequence as substantially shown in SEQ ID NO: 1, and fragments thereof. The "DNA molecules containing nucleotide sequences coding for a glucan elicitor receptor" include all degenerate isomers. The term "degenerate isomers" means DNA molecules coding for the same polypeptide with different degenerate codons. If a DNA molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2 is taken as an example, a DNA molecule in which a codon for any amino acid, e.g., AAC for Asn is changed to a degenerate codon AAT is called a degenerate isomer. Examples of such degenerate isomers include DNA molecules containing the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 2.

In another aspect, the present invention provides DNA molecules containing nucleotide sequences coding for a glucan elicitor receptor, which are incorporated in plasmid pER23-1, and fragments thereof. *E. coli* DH5 α EKB633 transformed with plasmid pER23-1 was deposited with the National Institute of Bioscience and Human-Technology, the Agency of Industrial Science and Technology, on June 15, 1994 under Accession Number FERM BP-4699.

The fragments of the DNA molecules containing nucleotide sequences coding for the glucan elicitor receptor of the present invention may contain a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

The DNA molecules of the present invention which contain nucleotide sequences coding for a glucan elicitor receptor and fragments thereof may optionally bind to an ATG codon for initiation methionine together with a translation frame in the upstream portion toward the 5' end and also bind to other DNA molecules having appropriate lengths as non-translation regions in the upstream portion toward the 5' end and the downstream portion toward the 3' end.

The DNA molecules of the present invention which contain nucleotide sequences coding for a glucan elicitor receptor and fragments thereof can be present typically in the form of parts of constituents of plasmid or phage DNA molecules or in the form of parts of constituents of plasmid, phage or genomic DNA molecules which are introduced into microorganisms (particularly, bacteria including *E. coli* and *Agrobacterium*), phage particles or plants.

In order to express stably the DNA molecules coding for a glucan elicitor receptor and fragments thereof in plants, a promoter, a DNA molecule (ATG) encoding the initiation codon and a terminator may be added to the DNA molecules of the present invention and fragments thereof in appropriate combinations. Examples of the promoter include the pro-

motor of genes encoding ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit (Fluhr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83: 2358), the promoter of a nopaline synthase gene (Langridge et al., Plant Cell Rep. (1985) 4:355), the promoter for the production of cauliflower mosaic virus 19S-RNA (Guilley et al., Cell (1982) 30:763), the promoter for the production of cauliflower mosaic virus 35S-RNA (Odell et al., Nature (1985) 313:810) and the like. Examples of the terminator include the terminator of a nopaline synthase gene (Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen. (1982) 1:561) and the terminator of an octopine synthase gene (Gielen et al., EMBO J. (1984) 3:835).

The DNA molecule containing a nucleotide sequence coding for a glucan elicitor receptor can be obtained by a method comprising the steps of chemically synthesizing at least a part of the DNA molecule according to a conventional procedure of synthesis of nucleic acids and obtaining a desired DNA molecule from an appropriate cDNA library using the synthesized DNA molecule as a probe by a conventional method, for example, an immunological method or a hybridization method. Some plasmids, various kinds of restriction enzymes, T4DNA ligase and other enzymes for use in the above method are commercially available. The DNA cloning, the construction of plasmids, the transfection of a host, the cultivation of the transfectant, the recovery of DNA molecules from the culture and other steps can be performed by the methods described in Molecular Cloning, J. Sambrook et al., CSH Laboratory (1989), Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1987) and others.

More specifically, the DNA molecules of the present invention which contain nucleotide sequences coding for a glucan elicitor receptor can be obtained as follows:

Two kinds of partial amino acid sequences are selected from the amino acid sequences of a glucan elicitor receptor. Primers consisting of combinations of all bases which can encode the C terminus of the selected partial sequence and primers consisting of combinations of all bases which can encode the N terminus of the selected partial sequence are prepared. These synthesized primers are used as mixed primers to perform two PCR using DNA molecules of an appropriate soybean cDNA library as a template. Subsequently, two amplified fragments of given lengths whose amplification is expected (these fragments correspond to DNA molecules encoding the above two partial amino acid sequences) are picked up and the nucleotide sequences thereof are determined. On the basis of the determined nucleotide sequences, a primer having nucleotide sequences coding for the C terminus of an amino acid partial sequence positioned at the C terminal side of the glucan elicitor receptor and a primer having nucleotide sequences coding for the N terminus of an amino acid partial sequence positioned at the N terminal side of the glucan elicitor receptor are synthesized. These two synthesized primers are used to perform a PCR using the DNA molecules of the above soybean cDNA library as a template. The resulting amplified fragments are used as probes to hybridize the aforementioned soybean cDNA library, thereby yielding DNA molecules containing nucleotide sequences coding for the glucan elicitor receptor.

The obtained DNA molecules containing nucleotide sequences coding for the glucan elicitor receptor can be sequenced by any known methods, for example, the Maxam-Gilbert method (Methods Enzymol., 65:499, 1980), a dideoxynucleotide chain termination method using M13 phage (J. Messing, et al., Gene, 19:269, 1982) and the like.

Since the results of various studies on glucan elicitor suggest that a glucan elicitor receptor plays an important role in resistance to fungi in plants, it is expected that the DNA molecules coding for glucan elicitor receptor of the present invention and fragments thereof can impart fungal resistance to plants if they are introduced and expressed in plant cells (particularly higher plant cells) which have no glucan elicitor receptor according to a conventional procedure. It has been proposed that fungi capable of infecting plants have generally suppressors, thereby acquiring an ability to suppress the fungal resistance of the plants. It is expected that new plants having resistance to fungi can be developed by introducing and expressing the DNA molecules coding for glucan elicitor receptor of the present invention and fragments thereof such that the ER works or by modifying the DNA molecules and fragments thereof or by regulating their expression amounts. Moreover, if the DNA molecules of the present invention and fragments thereof are introduced and expressed in plant cells, particularly in higher plant cells, together with fungal resistance enhancing genes or characters such as the gene of glucanase which imparts fungal resistance to plants, it is expected that higher fungal resistance can be imparted to plants than in the case where the gene of glucanase is introduced.

Vectors used for introducing the DNA molecules coding for the glucan elicitor receptor and fragments thereof may be constructed such that the glucan elicitor receptor can be stably expressed in plants. More specifically, a promoter, a DNA molecule encoding the initiation codon (ATG) and a terminator may be added to the DNA molecules coding for the glucan elicitor receptor and fragments thereof in appropriate combinations. Examples of the promoter include the promoter of genes encoding ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit (Fluhr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:2358), the promoter of a nopaline synthase gene (Langridge et al., Plant Cell Rep. (1985) 4: 355), the promoter for the production of cauliflower mosaic virus 19S-RNA (Guilley et al., Cell (1982) 30:763), the promoter for the production of cauliflower mosaic virus 35S-RNA (Odell et al., Nature (1985) 313:810) and the like. Examples of the terminator include the terminator of a nopaline synthase gene (Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen. (1982) 1:561) and the terminator of an octopine synthase gene (Gielen et al., EMBO J. (1984) 3:835).

The DNA molecules coding for a glucan elicitor receptor and fragments thereof can be introduced into plant cells by any usual known methods, for example, the method described in "Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual", J. Draper, et al. eds., Blackwell Scientific Publications, 1988. Examples of the methods include

biological methods such as those using viruses or *Agrobacteria* and physicochemical methods such as electroporation, a polyethylene glycol method, microinjection and the like.

The present invention will now be explained in greater detail with reference to the following examples which are by no means intended to limit the scope of the present invention.

Example 1

Purification of soybean root-derived ER

1) Measurement of glucan elicitor binding activity of ER

A complex of an elicitor (average molecular weight: 10,000) and tyramine (TOKYO KASEI KOGYO CO., LTD.) was synthesized by the method of Jong-Joo Cheong (The Plant Cell (1991) 3: 127). The elicitor-tyramine complex was labelled with iodine using chloramine T.

A sample (protein amount < 500 µg) was suspended in 500 µl of an assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M saccharose, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF and 5 mM EDTA) and incubated at 0 °C for 2 hours. The iodine-labelled elicitor-tyramine complex in an amount of 7.0 nM (70 Ci/mmol, the number of moles is calculated on the assumption that the molecular weight of the elicitor is 10,000, and this applies to the following description) was added to the suspension and the mixture was incubated at 4 °C for 2 hours. The reaction solution was filtered through Whatman GF/B as treated with a 0.3% aqueous solution of polyethylene imine for at least 1 hour. The residue was washed 3 times with 5 ml of an ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂). The radio activity retained on the filter was counted with a gamma counter (count A). In order to eliminate the effect of non-specific binding, the same procedure as above was performed except that 17 µM of the elicitor was added to the same sample, the mixture was suspended in the assay buffer and the suspension was incubated at 0 °C for 2 hours. The obtained count was subtracted from the count A to give a count (Δ cpm) of elicitor-specific binding. The resulting count (Δ cpm) was divided by the total number of counts and then multiplied by the total amount of elicitor used in the experiment to calculate the amount of the elicitor-binding protein (in moles).

The purity of ER was checked by the above method.

2) Purification of soybean root-derived ER

Soybean (*Glycine max* cv. Green Homer) seeds (Takayama Seed Co.) were cultured on vermiculite for 1 week and then aquacultured for 15 days to harvest roots (about 40 kg, wet weight). The harvested roots were stored at -80 °C until they were used for the purification of ER. An ice-cold buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.0, 30 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 2.5 mM potassium metabisulfite and 1 mM PMSF) was added to the roots (2 kg, wet weight) in an amount of 1.25 L and the mixture was homogenized with a Waring Blender for 2 minutes.

The resulting slurry was filtered through a Miracloth (Calbiochem Co.) and the filtrate was centrifuged at 9,000 rpm at 4 °C for 15 minutes. The supernatant was ultracentrifuged at 37,000 rpm at 4 °C for 20 minutes. The precipitate was suspended in 160 ml of an ice-cold buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF and 5 mM EDTA) to give a membrane fraction. An ampholytic detergent ZW3-12 (Boehringer Co.) was added to the membrane fraction to give a final concentration of 0.25% for solubilization of ER from the membrane fraction and the mixture was stirred at 8 °C for 30 minutes. The resulting mixture was ultracentrifuged at 37,000 rpm at 4 °C for 20 minutes to collect the supernatant containing the solubilized ER (soluble fraction). The soluble fraction (165 ml) was dialyzed against 2 l of a buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% ZW3-12, 4 °C) 4 times. Five milliliters of Protrap (TAKARA SHUZO CO., LTD.) was added to the sample and the mixture was stirred at 8 °C for 30 minutes to remove proteases from the sample and to stabilize ER. The resulting mixture was centrifuged at 2,800 rpm at 4 °C for 2 minutes to collect the supernatant. The obtained supernatant (160 ml) was concentrated to about 50 ml using an ultrafiltration membrane YM-10 (Amicon Co.) and the concentrate was dialyzed against an A buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA and 0.2% ZW3-12, 4 °C).

The dialysate was applied to Q-Sepharose HP 26/10 (Pharmacia Co.) and ER was eluted in a linear gradient of 0-1 M NaCl (Q-Sepharose active fraction). The ER was eluted at a NaCl concentration of about 0.45 M. The Q-Sepharose active fraction was diluted 3 folds with A buffer and the diluted fraction was applied to Mono Q 10/10 (Pharmacia Co.). The ER was eluted in a linear gradient of 0-1 M NaCl (Mono Q active fraction, 8 ml). The ER was eluted at a NaCl concentration of about 0.25 M.

The ER was purified with an affinity gel using an elicitor as a ligand as follows:

Elicitor was prepared according to N. T. Keen with some modifications (Plant Physiol. (1983) 71: 460, Plant Physiol. (1983) 71: 466). Briefly, the mycelial wall of pathogenic *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* race 1 (ATCC34566) was treated with zymolyase 100T (KIRIN BREWERY CO., LTD.) to liberate an elicitor. After the treatment, Zymolyase 100T was eliminated by the adsorption on CM-cellulose packed in a column. The resulting passage-through fraction

was purified with a gel permeation chromatography G-75 (Pharmacia Co.) to collect an elicitor fraction whose average molecular weight was 10,000 Da. The glyceollin-inducing elicitor activity of the collected fraction was determined by the method of M. Yoshikawa (Nature (1978) 257:546). The addition of 8 µg of the elicitor to soybean cotyledons resulted in the induction of about 550 µg of glyceollin after 24 hours incubation.

In order to eliminate non-specific adsorption on the gel carrier, Mono Q active fraction was collected and stirred with about 33 mg of maltose-coupled glass gel (bed volume: about 100 µl) at 8 °C for 1 hour. The gel was precipitated by centrifugation (1,000 rpm, 4 °C, 2 minutes) to collect the supernatant (maltose-coupled glass gel passage-through fraction). The maltose-coupled glass gel was prepared by the method of A.M. Jeffrey et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975) 62: 608). Briefly, 120 mg of maltose and 6 g of Glass Aminopropyl (Sigma Co.) were suspended in 36 ml of H₂O and the suspension was stirred at room temperature overnight. To the resulting suspension was added 36 ml of ethanol. Immediately thereafter a solution of sodium borohydride (864 mg) in ethanol (72 ml) was added to the mixture. The resulting mixture was sonicated for 2 minutes and stirred at room temperature for 5 hours. Water (288 ml) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was cooled with ice and adjusted to pH 5.6 with acetic acid. The gel was washed with about 1.8 L of H₂O to remove the free maltose. Maltose contained in the washing solution was determined quantitatively by the method of J. H. Roe (J. Biol. Chem. (1955) 212:335) using an anthrone reagent. An amount of the gel-coupled maltose was estimated from the amount of the maltose contained in the washing solution. As a result, it was found that 60 mg of maltose was coupled to 6 g of Glass Aminopropyl.

About 17 mg of the elicitor-coupled glass gel (bed volume: about 50 µl) was added to 8 ml of the maltose-coupled glass gel passage-through fraction and the mixture was stirred gently at 8 °C overnight. The gel was collected by centrifugation (1,000 rpm, 4 °C, 2 minutes) and washed with 2 bed volumes of A buffer 2 times. The gel was washed additionally with 4 bed volumes of 0.1% SDS 3 times to collect gel-coupled ER (elicitor-coupled glass gel eluted fraction). The elicitor-coupled glass gel was prepared by the method of A.M. Jeffrey et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975) 62: 608). Briefly, elicitor (37 mg) and Glass Aminopropyl (490 mg) were suspended in 6 ml of H₂O and stirred at room temperature overnight. Ethanol (6 ml) was added to the suspension and a solution of sodium borohydride (144 mg) in ethanol (12 ml) was added immediately thereafter. The mixture was sonicated for 2 minutes and stirred at room temperature for 5 hours. To the resulting mixture was added 48 ml of H₂O. The mixture was cooled with ice and adjusted to pH 5.6 with acetic acid. The free elicitor was determined quantitatively with an anthrone reagent. The amount of the gel-coupled elicitor was estimated from the amount of the free elicitor contained in the washing solution. As a result, it was found that 34 mg of the elicitor was coupled to 490 mg of Glass Aminopropyl.

The protein and ER amounts in the above steps for purification are summarized in Table 1.

Table 1

Protein and ER Amounts in the Steps for Purification (Soybean roots weighing 40 kg on a wet basis were used as a starting material)		
	Protein (mg)	ER (pmol)
Membrane Fraction	17900	30
Soluble Fraction	2000	214
Q-Sepharose Active Fraction	190	205
Mono Q Active Fraction	49	233
Maltose-Coupled Glass Gel Passage-through Fraction	45	220
Elicitor-Coupled Glass Gel Eluted Fraction	0.004*	45

* : Estimated from the band intensity obtained by silver stain after SDS-PAGE.

The Mono Q active fraction, passage-through fraction from maltose-coupled glass gel and eluted fraction from elicitor-coupled glass gel (10 µl each) were electrophoresed on an electrophoretic gradient gel, SDS-PAGE plate 10/20 (Daiich Kagaku Yakuhin Co.) and stained with silver (Daiich Kagaku Yakuhin Co.) The electrophoresis patterns are shown in Figure 1. In Figure 1, lane 1 is the Mono Q active fraction, lane 2; the passage-through fraction from the maltose-coupled glass gel and lane 3; the eluted fraction from the elicitor-coupled glass gel. Figure 1 shows that the ER bands were detected at a molecular weight of about 70,000 Da.

The protein of about 70,000 in molecular weight was labelled with iodine-125 by using an ¹²⁵I-labelled complex of a photoaffinity reagent SASD (Pierce Co.) and the elicitor. The SDS-PAGE band of the membrane fraction was transferred on a PVDF membrane by western blotting and incubated with the same ¹²⁵I-labelled elicitor as used in measur-

ing the elicitor-binding activity of ER on the PVDF membrane so that the protein of about 70,000 Da in molecular weight was labeled with iodine-125. These facts reveal that the protein of about 70,000 Da in molecular weight had an elicitor-binding activity.

About 4 µg of ER was purified from about 40 kg by wet weight of the soybean root by the above method.

3) Analysis of ER-fragmented peptides

The ER was fragmented by protease digestion to peptides. The amino acid sequences of the fragmented peptides were determined by the method of Iwamatsu (Akihiro Iwamatsu, Seikagaku (1991) 63: 139, A. Iwamatsu, Electrophoresis (1992) 13: 142). A solution of the ER purified by the above method was concentrated to about 100 µl with Centricon-30 (Amicon Co.) and subjected to a 10-20% polyacrylamide SDS electrophoresis. The resulting protein bands were transferred on a PVDF membrane (Millipore Co.) with an electroblotting apparatus (Sartrius Co.). The bands transferred on the PVDF membrane were stained with 0.1% Ponceau S (Sigma Co.)/1% acetic acid. The main band of 70,000 Da in molecular weight was sectioned and decolorized with 0.5 mM NaOH. This band was reductively S-carboxymethylated. Lysylendopeptidase (AP-1) was added to the resulting band at an enzyme:substrate (mol:mol) ratio of 1:100 and the mixture was reacted at 30 °C for 16 hours. The resulting fragmented peptides were applied to a µ-Bondasphere 5 µ C8-300 Å (2.1 x 150 mm, Waters) column equilibrated with 98% solvent A and 2% solvent B and eluted in a 2-50% linear gradient of solvent B for 30 minutes at a flow rate of 0.25 ml/minute (solvent A: 0.05% TFA solution, solvent B: 0.02% TFA in 2-propanol:acetonitrile=7:3 (v/v)). Eluted peptides were detected by absorbance at 214 nm and each peak fraction was collected manually. The obtained peak fractions were analyzed with a gas-phase protein sequencer (Model 470A of Applied Biosystems). As a result of analysis of all the peak fractions obtained, the following amino acid sequences of the fragmented peptides were clearly determined.

- #1: Val Asn Ile Gln Thr Asn Thr Ser Asn Ile Ser Pro Gln (N-terminus)
- #5: Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val Gly Asp Ser
- #6: Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp
- #7: Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile Lys (mix sequence)

Example 2

Cloning of soybean ER gene

1) Preparation of soybean mRNA

Soybean (*Glycine max* cv. Green Homer) seeds (Takayama Seed Co.) were cultured on vermiculite for 1 week and aquicultured for 15 days to harvest roots (about 40 kg, wet weight). A portion of the harvested roots was stored at -80°C until it was used. Total RNA was obtained by the method of Ishida (Cell Technology Laboratory Manipulation Manual, Kodansha Scientific). Briefly, the stored roots (28.5 g, wet weight) were ground on a mortar while adding liquid nitrogen. To the obtained powder, 35.6 ml of a GTC solution held at 65°C was added and the mixture was homogenized with a Waring Blender. The resulting suspension was centrifuged at 6,000 rpm at room temperature for 15 minutes to collect 40 ml of the supernatant. The supernatant was layered gently on a cushion solution of cesium in a centrifuge tube and centrifuged at 35,000 rpm at 25 °C for 20 hours. The resulting precipitate was dissolved in 9 ml of TE/0.2% SDS. After phenol/chloroform extraction was conducted 2 times, total RNA (4.37 mg) was recovered by ethanol precipitation.

The obtained total RNA (2.2 mg) was purified with oligotex dT30 (Japan Roche Co.) according to the manual to yield 60 µg of poly(A) + rRNA.

2) Preparation of soybean cDNA library

cDNA molecules were synthesized from 5 µg of the poly(A)+rRNA with a cDNA synthesis kit (Pharmacia Co.) according to the manual. The synthesized cDNA fragments were ligated to lambda phage vector λ gt10 (Stratagene Co.) with T4 ligase (TAKARA SHUZO CO., LTD.). Gigapack (Stratagene Co.) was used to package a DNA mixture into the phage particles to prepare a soybean cDNA library of about 1.5×10^6 pfu. The library was amplified to 160 ml of a soybean cDNA library of 1.6×10^{11} pfu/ml.

Total DNA in the cDNA library was prepared as follows:

Chloroform/isoamylalcohol (24:1) was added to 500 µl of a phage solution (1.6×10^{11} pfu/ml) in an equal amount. The mixture was shaken for 30 seconds and centrifuged to collect the aqueous layer. The aqueous layer was extracted again with chloroform/isoamylalcohol (24:1). To the resulting aqueous layer were added 5 µl of a 3 M sodium acetate solution (pH 5.4) and 125 µl of ethanol and the mixture was centrifuged to collect the precipitate. The precipitate was

washed with a 70% ethanol solution and dissolved in a 10 mM Tris-HCl solution (pH 8) containing 1 µg/ml RNase A (Sigma Co.). This solution was used as a PCR template.

3) Amplification and Cloning of Soybean ER cDNA Fragments by PCR

The following four oligodeoxynucleotides (mixed primers U5, U7, U10 and U12) were synthesized with an automatic nucleic acid synthesizer (Model 394 of Applied Biosystems Co.) on the basis of the amino acid sequences of the fragmented peptides obtained in Example 1 (#5 and #6):

Primer U5 5'-AARAGYATHGAYGGNGA-3'
 Primer U7 5'-WRTCNCCNACNAC-3'
 Primer U10 5'-GTNAAAYARATNCARAC-3'
 Primer U12 5'-ARRTTNAGRAARTCYTC-3'

(R:A/G, Y:C/T, W:A/T, H:A/C/T, N:A/G/T/C)

The total DNA in 0.5 µg of the cDNA library was dissolved in 79 µl of distilled water. Either a combination of primers U5 and U7 or a combination of primers U10 and U12 (100 pmol each) and 0.5 µl of Taq DNA polymerase (TAKARA SHUZO CO., LTD.) were added to 8 µl of 2.5 mM dNTP in 10 µl of a 10 x PCR buffer (attached to Taq DNA polymerase of TAKARA SHUZO CO., LTD.) to give a final amount of 100 µl. PCR reaction was performed with a Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Co.) by 50 cycles of 1) denaturation at 94 °C x 30 seconds, 2) renaturation at 47°C x 30 seconds and 3) elongation at 72 °C x 1 minute. After the reaction, 15 µl of the reaction solution was electrophoresed on a 15% polyacrylamide gel. The gel was stained with a 0.5 µg/ml ethidium bromide solution for 10 minutes. The bands showing specifically amplified fragments of 40 bp and 47 bp whose amplification was expected were sectioned while observing under UV light. The gel sections were ground with a plastic bar and eluted with an elution buffer (0.5 M ammonium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM EDTA and 0.1% SDS) overnight to collect a DNA-containing solution.

The collected DNA fragments were cloned into plasmid pT7Blue(R) with a pT7Blue T-Vector Kit (Novagene Co.). The obtained plasmids p#5-1, 2, and p#6-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 were sequenced with a fluorescence automatic DNA sequencer (Model 373A of Applied Biosystems Co.). The results showed that the resulting amplified DNA fragments other than the primers also encoded the amino acid sequences of fragmented peptides #5 and #6.

The following two oligodeoxynucleotides (mixed primers U18 and U19) were synthesized with an automatic nucleic acid synthesizer on the basis of the results of the DNA sequencing.

Primer U18 5'-AAGTAYAAGCCRCAAGCCTATTCA-3'
 Primer U19 5'-ATCGCCRACAACMCCAA-3'

(Y and R are as defined above, M:A/C)

The total DNA in 0.5 µg of the cDNA library was dissolved in 79 µl of distilled water. A combination of primers U18 and U19 (100 pmol each) and 0.5 µl of Taq DNA polymerase were added to 8 µl 2.5 mM dNTP in 10 µl of a 10 x PCR buffer to give a final amount of 100 µl. PCR reaction was performed by 40 cycles of 1) denaturation at 94°C x 30 seconds, 2) renaturation at 52°C x 30 seconds and 3) elongation at 72 °C x 1 minute. Fifteen microliters of the reaction solution was electrophoresed on a 1% agarose gel.

The gel was stained with a 0.5 µg/ml ethidium bromide solution for 15 minutes. The band showing a specifically amplified fragment of about 540 bp was sectioned while observing under UV light. The gel section was treated with Gene Clean II (Bio101 Co.) to collect a DNA-containing solution.

The collected DNA fragment was cloned into plasmid pT7Blue(R) with a pT7Blue T-Vector Kit. The obtained plasmid p#5-#6 was sequenced with a fluorescence sequencer. The results showed that the amplified DNA fragment consisted of 539 bp and encoded not only the amino acid sequences of fragmented peptides #5 and #6 at the both sides, but also peptide #7 in the amplified portion.

4) Screening and Cloning of Library by Hybridization

Plasmid #5-#6 into which the ER cDNA fragment was cloned was digested with restriction enzymes BamHI and PstI. A DNA fragment of about 540 bp was recovered and used as a probe. The recovered DNA fragment was labelled with [α -³²P] dCTP using a Megaprime DNA labelling system (Amersham Co.) according to the manual and the reaction solution was used in a hybridization experiment.

A phage of the cDNA library was infected with E. coli C600 hfl (Invitrogen Co.) and inoculated in a 10 mg/ml MgCl₂-containing L medium on plates of about 15 cm in diameter to form a total of about 1 x 10⁶ of plaques. The plaques were blotted on a nylon membrane (Hybond-N; Amersham Co.). The membrane was reacted with the ³²P-dCTP labeled ER

cDNA fragment and positive phages detected by autoradiography were screened again in the same way to give about 30 phage clones having different signal intensities. Clone λ ER23 having the longest inserted DNA fragment was selected.

The λ phage DNA molecule was purified with a LambdaSorb (Promega Co.) from a solution of the positive clone λ ER23 isolated in the hybridization experiment. Ten microliters of a 10 x EcoRI cleavage buffer (restriction enzyme EcoRI 10 U) was added to 5 μ g of the DNA solution to give a total amount of 100 μ l and the mixture was reacted at 37 °C overnight. The reaction solution was electrophoresed on a 1% agarose gel. A band of about 2.3 kb was sectioned and treated with a Gene Clean II (Bio101 Co.) to collect a DNA-containing solution. Vector pBluescriptII KS- (0.02 μ g) (Stratagene Co.) was cleaved with restriction enzyme EcoRI.

After the two DNA solutions were mixed, 2 μ l of a 10 x ligase buffer and 0.2 μ l of T4 DNA ligase (TAKARA SHUZO CO., LTD) were added to give a total amount of 20 μ l. The mixture was reacted at 16 °C for 4 hours and the reaction mixture solution was used to transform E. coli DH5 α (Gibco BRL Co.). A 2% agar plate medium was prepared with 25 ml of an L medium containing 50 μ g/ml ampicillin, 40 μ g/ml IPTG and 40 μ g/ml X-gal. The transformed E. coli was inoculated on the agar plate medium and grown at 37°C overnight. White colonies were selected from the formed colonies and cultured in 3 ml of an L medium containing 50 μ g/ml ampicillin at 37 °C for 8 hours. Plasmids were recovered from these bacterial cells by an alkali method and determined whether they were clones into which a desired fragment was cloned with the restriction enzyme, thereby giving plasmids pER23-1 and pER23-2 (5225 bp) which had opposite orientations to the vector. The maps of plasmids pER23-1 and pER23-2 are shown in Figure 2.

5) Determination of the Nucleotide Sequence of the ER-encoding Clone

The DNA nucleotide sequences of plasmids pER23-1 and pER23-2 were determined in both orientations with a fluorescence sequencer by 1) using plasmids pER23-1 and pER23-2 digested by appropriate restriction enzymes, 2) using appropriate primers synthesized on the basis of the information about already determined nucleotide sequences, or 3) cleaving pER23-1 with restriction enzymes KpnI and XhoI and pER23-2 with restriction enzymes KpnI and Clal and then using a kilosequence deletion kit (TAKARA SHUZO CO., LTD) to prepare plasmids having a deletion at intervals of about 200-300 bp. The DNA nucleotide sequence is shown in SEQ ID NO: 2 of the SEQUENCE LISTING. The results showed that the DNA fragment contained a 667 amino acid-encoding open reading frame of 2001 bp beginning at a nucleotide sequence corresponding to the N-terminal sequence (fragmented peptide #1) sequenced with the amino acid sequencer. The amino acid sequence is shown in SEQ ID NO: 1 of the SEQUENCE LISTING. The amino acid sequence deduced from the resulting DNA nucleotide sequence was consistent with the previously determined amino acid sequence of the soybean ER.

In addition, highly homologous amino acid sequences were searched for with a nucleic acid and amino acid sequence analysis software package (MacVector: Kodak Co.) using a nucleic acid and amino acid sequence data base (Entrez: NCBI). However, no amino acid sequences were found to be highly homologous to the heretofore known sequences. Hence, it is clear that the prepared ER is a novel protein.

Example 3

Expression of the Soybean ER in Tobacco Plants

1) Construction of Plant Expression Plasmid pKV1-ER23

As shown in Figure 3, a plant expression vector pKV1 to be used in this example was prepared from cauliflower mosaic virus 35S promoter-containing plasmid pCaP35J (J. Yamaya et al. (1988) Mol. Gen. Genet. 211:520) as follows:

Plasmid pCaP35J was digested completely with restriction enzyme BamHI to delete a multi-cloning site present upstream of the 35S promoter. Following partial digestion with PvuII, a treatment was conducted with Klenow fragments (TAKARA SHUZO CO., LTD) to make blunt ends. The resulting plasmid DNA was circularized by ligation and introduced into E. coli DH5 α . A desired plasmid was selected from the resulting clones. The selected plasmid was digested with restriction enzyme PstI to insert a multi-cloning site present downstream of the 35S promoter. A treatment was conducted with Klenow fragments to make blunt ends. The resulting plasmid DNA was digested with HindIII. The following synthetic linker DNAs were synthesized with an automatic nucleic acid synthesizer, annealed and ligated to the HindIII-digested plasmid. The resulting plasmid DNA was introduced into E. coli DH5 α . Desired plasmid pCaP35Y (2837 bp) was selected from the obtained clones.

5' -GGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA-3' (SEQ ID NO: 3)

5' -CCTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCTGA-3' (SEQ ID NO: 4)

In order to introduce a terminator of nopaline synthase into the pCaP35Y, plasmid pBI121 (Clontech Co.) was digested with SacI and EcoRI and the SacI-EcoRI fragment was treated with Klenow fragments to make blunt ends; then, the resulting fragment of pBI121 was ligated to plasmid pCaP35Y in which blunt ends were made at a HindIII site downstream of the 35S promoter. The resulting plasmid DNA was introduced into E. coli DH5 α . A desired plasmid was selected from the obtained clones. In order to introduce a kanamycin-resistance cassette into the selected plasmid, the latter was digested with PvuII and ligated to a fragment (about 1620 bp) of pLGVneo1103 (R. Hain et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 161) that was obtained by the steps of cleavage at a PvuII site present downstream of the octopine synthase terminator, treatment with Bal31 (TAKARA SHUZO CO., LTD) to make a deletion, cleavage at a EcoRI site upstream of a nopaline synthase promoter, and the creation of a blunt end at both ends. The resulting plasmid DNA was introduced into E. coli DH5 α . Desired plasmid, or plant expression vector pKV1 (4828 bp), was selected from the obtained clones.

The prepared pKV1 was digested at unique sites by restriction enzymes BamHI and Sall and ligated to the ER gene-containing fragment (i.e., the BamHI-Sall fragment of pEB23-1, about 2.3 kbp). The resulting plasmid DNA was introduced into E. coli DH5 α . Desired ER-expression plasmid pKV1-ER23 (about 7.1 kbp) was selected from the obtained clones.

2) Transient Expression of ER in Cultured Tobacco Cells

The ER gene was introduced into cultured tobacco cells by electroporation for transient ER expression by a partial modification of Watanabe's method (Y. Watanabe (1987) FEBS 219: 65). The DNA molecules of the plasmid pKV1-ER23 were purified by an alkali method. Cultured tobacco cells were obtained by the method of Hirai et al. (Plant Cell Cultivation Manual, Gakkai Shuppan Center, 1982) for use in the transient expression of ER. Tobacco seeds (variety Bright Yellow, provided by Professor Hirofumi Uchimiya of University of Tokyo) were sterilized with a 1% sodium hypochlorite solution and then germinated. The tobacco juvenile tissues just after the germination were transplanted in a tobacco cultivation agar medium (Murashige-Skoog medium (Flow Laboratories Co.) supplemented with 2 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3% sucrose and 8% agar) to induce calluses after 3 weeks. About 1 g of callus masses were suspended in 50 ml of a tobacco cultivation medium (Murashige-Skoog medium (Flow Laboratories Co.) supplemented with 2 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3% sucrose) to prepare cultured cells. These tobacco cells were cultured until they entered a logarithmic growth phase. The cultured cells were collected by centrifugation (600 rpm, 3 minutes) and suspended in a solution consisting of 1% cellulase Onozuka (Yakult Co.), 1% Dricelase (Kyowa Hakko Co., Ltd.), 0.1% Pectriase (Seishin Seiyaku Co.) and 0.4 M D-mannitol (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) and which was adjusted to pH 5.7 with HCl. Reaction was performed at 30 °C for 90 minutes to prepare protoplasts. The reaction solution was washed with 0.4 M D-mannitol at 4 °C by 3 cycles of centrifugation to remove the enzyme solution. The operation of electroporation consisted of suspending 1×10^6 cells in 0.8 ml of an electroporation solution (70 mM KCl, 5 mM MES and 0.3 M mannitol), mixing the suspension with 10 μ g of the DNA molecules of pKV1-ER23 and treating the mixture with a genepluser (Biorad Co.) at 125 μ F and 300 V in an electroporation cuvette (Biorad Co., electrode spacing: 0.4 cm). After the treatment, the solution was collected with a pasteur pipet and left to stand on ice for 30 minutes. Reaction was performed at 30 °C for 5 minutes and the reaction solution was resuspended in a protoplast medium (Murashige-Skoog medium (Flow Laboratories Co.) supplemented with 0.2 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1% sucrose and 0.4 M mannitol and adjusted to pH 5.7). The cells were left to stand in the dark at 25°C overnight and collected by centrifugation (8,000 rpm, 3 minutes). Sixty microliters of a suspension buffer (25 mM Tris-HCl pH7.0, 30 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 2.5 mM potassium metabisulfite and 1 mM PMSF) were added to the cells and the mixture was stirred on a vortex for 3 minutes. The resulting sample was stored at -80°C until an elicitor-binding experiment was conducted.

For control, the above procedure was repeated except that the DNA molecule of pKV1 instead of pKV1-ER23 was introduced into tobacco cells.

3) Stable Expression of ER in Tobacco Suspension Cultured Cells

Transformed cultured tobacco cells capable of constant ER gene retention were selected as follows from the cultured tobacco cells capable of transient ER expression:

The protoplasts obtained in the preparation of the cultured tobacco cells capable of transient ER expression were suspended in a 1% agarose-containing protoplast medium (Murashige-Skoog medium (Flow Laboratories Co.) supplemented with 0.2 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1% sucrose and 0.4 M mannitol and adjusted to pH 5.7). The suspension was dropped on a plate with a dropping pipet before the agarose solidified, whereby the protoplasts were fixed in the bead-like solid medium. After the agarose solidified, an agarose-free protoplast medium was added to the plate, thereby immersing the protoplast-fixing agarose medium in the liquid medium. After the protoplasts were cultured in the dark for 1 week, kanamycin was added to a final concentration of 100 µg/ml and the cultivation was continued. Transformants selected from the grown colonies were transferred in a kanamycin-containing liquid medium and cultured.

Two clones (I 1 and I 6) of cultured tobacco cells stably transformed by pKV1-ER23 and two clones (C 2-1 and C 2-4) of cultured tobacco cells stably transformed by pKV1 were obtained.

4) Elicitor-binding Activity Experiment

The elicitor-binding activity was measured as follows:

A complex of an elicitor and tyramine (TOKYO KASEI KOGYO CO., LTD.) was synthesized by the method of Jong-Joo Cheong (The Plant Cell (1991) 3: 127). The elicitor-tyramine complex was labelled with iodine-125 using chloramine T. The resulting sample (protein amount < 500 µg) was suspended in 500 µl of an assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M saccharose, 5 mM MgCl₂, 1mM PMSF and 5 mM EDTA) and incubated at 0°C for 2 hours. The iodine-labelled elicitor-tyramine complex in an amount of 100 nM (70 Ci/mmol) was added to the suspension and the mixture was incubated at 4 °C for 2 hours. The reaction solution was filtered through Whatman GF/B (as treated with a 0.3% aqueous solution of polyethylenimine for at least 1 hour) and washed 3 times with 5 ml of an ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂). The radio activity retained on the filter membrane was counted with a gamma counter (count A). In order to eliminate the effect of non-specific binding, the same procedure as above was performed except that 17 µM of the elicitor was added to the same sample, the mixture was suspended in the assay buffer and the suspension was incubated at 0 °C for 2 hours. The obtained count was subtracted from the count A to give a count (Δ cpm) of elicitor-specific binding. The resulting count (Δ cpm) was divided by the total number of counts and then multiplied by the total amount of elicitor used in the experiment to calculate the amount of the elicitor-binding protein (in moles).

As a result, a specific binding to the elicitor was observed in the tobacco cells transformed with the DNA molecule of pKV1-ER23, whereas no specific binding to the elicitor was observed in the control tobacco cells in which the DNA molecule of pKV1 was introduced (Table 2). This fact reveals that the gene obtained above encodes a protein having the elicitor-binding activity.

Table 2

Elicitor-binding Activity of Cultured Tobacco Cells		
Fraction	Transforming DNA	Binding Activity (fmol/mg)
Transient Expression	pKV1	< 0
	pKV1-ER23	90.5
Stable Expression		
C2-1	pKV1	< 0
C2-4	pKV1	< 0
I 1	pKV1-ER23	150
I 6	pKV1-ER23	196

5) Transient Increase in Intracellular Ca^{2+} Concentration in Transformed Tobacco Cultured Cells by Addition of Glucan Elicitor

Plants recognize the elicitor at a receptor specific thereto and then promote the accumulation of phytoalexin or induce hypersensitive reaction to prevent fungus invasion. It has been reported for some plants that the inflow of calcium ion into cells in the early phase of such resistance reactions is important (U. Conrath et al. (1991) FEBS LETTERS 279: 141, M. N. Zook et al. (1987) Plant Physiol. 84: 520, F. Kurosaki et al. (1987) Phytochemistry 26: 1919; C. L. Preisig and R. A. Moreau (1994) Phytochemistry 36: 857). A report has also been made suggesting that the inflow of calcium ion into cells triggers the promotion of the phytoalexin accumulation in soybean which the present inventors used to obtain ER (M. R. Stab and J. Ebel (1987) Arch. Biochem. Biophys. 257: 416). Hence, if a transformed cultured tobacco cell is prepared by introducing the ER gene into an ER-free tobacco cultured cell to express the ER and if the intracellular calcium ion concentration is changed by the addition of a glucan elicitor, the change is anticipated to trigger a resistance reaction by the glucan elicitor in plants other than soybean (e.g., tobacco), thereby allowing them to show resistance to a wide variety of fungi which use glucan as a mycelial wall component.

The change in intracellular Ca^{2+} concentration of transformed cultured tobacco cells by the addition of the elicitor was examined.

In this experiment, the transformed cultured tobacco cells (I 6) obtained by the kanamycin selection and the plasmid-containing cultured tobacco cells (C 2-4) were used.

The intracellular Ca^{2+} concentrations of the cultured cells were measured as follows with an acetoxymethyl derivative (Fura-2 AM) of a fluorescence chelator (Fura-2) for Ca^{2+} measurement:

Cells were harvested from about 2 ml of the transformed tobacco cell culture (corresponding to a cell volume of about 250 ml after standing for 10 minutes) by centrifugation (600 rpm, 30 seconds) and the supernatant was removed. To the cells was added 2 ml of a tobacco cultivation medium and the mixture was stirred gently and centrifuged (600 rpm, 30 seconds) to remove the supernatant. The same operations were repeated to wash the cultured cells. The washed cultured cells was suspended homogeneously in 2 ml of the medium. To 1 ml of the suspension of the cultured cells in the medium, 1 ml of the medium and 4 μl of 1 mM Fura-2 AM (final concentration: 2 μM , Dojin Chemical Co.) were added and the mixture was incubated in the dark for 30 minutes with occasionally stirring. Subsequently, the cells were washed 2 times with 2 ml of the medium by centrifugation (600 rpm, 30 seconds) to eliminate the free Fura-2 AM which was not incorporated into the cells. The washed cultured cells were suspended in 2 ml of the medium homogeneously and the suspension (2 ml) was transferred into a fluorescence-measurement cell. The incorporated Fura-2 AM should be changed to Fura-2 by hydrolysis with intracellular esterase. The fluorescence produced by the binding of Fura-2 to intracellular Ca^{2+} was measured at a fluorescence wavelength of 505 nm under exciting light of 335 nm with the cultured cells being stirred to ensure against precipitation of the cultured cells. The change in intracellular Ca^{2+} concentration was examined by measuring the fluorescence intensity at specified intervals of time after the addition of 50 μl of glucan elicitor (1 mg/ml) or deionized water to the cultured cells. For control, the change in intracellular Ca^{2+} concentration was examined on the plasmid-containing cultured tobacco cells by the same method as above. For another control, the change in intracellular Ca^{2+} concentration was examined on cultured soybean cells by the same method as above, except that the cultured cells were washed with a medium for soybean cells having the following formulation.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 75mg/ml, KH_2PO_4 170mg/ml, KNO_3 2,200mg/ml, NH_4NO_3 600mg/ml, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 67mg/ml, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 310mg/ml, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 295mg/ml, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 28mg/ml, $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ 37.3mg/ml, KI 0.75mg/ml, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10.0mg/ml, H_3BO_3 3.0mg/ml, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mg/ml, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/ml, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/ml, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/ml, Inositol 100mg/ml, Nicotinic acid 1.0mg/ml, Pyridoxine \cdot HCl 1.0mg/ml, Thiamine \cdot HCl 10.0mg/ml, Glucose 5g/ml, Sucrose 25g/ml, Xylose 250mg/ml, Sodium pyruvate 5.0mg/ml, Citric acid 10.0mg/ml, Malic acid 10.0mg/ml, Fumaric acid 10.0mg/ml, N-Z-amine 500.0mg/ml, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid 1.0mg/ml and Zeatine riboside 0.1mg/ml, adjusted to pH 5.7 with KOH.

As a result of this experiment, about 7% transient increase in fluorescence intensity was observed in the cultured soybean cells 3 minutes after the addition of the elicitor, whereas no such change was observed after the addition of deionized water (Figure 4). The results suggest that the phenomenon in which the binding of the ER to the glucan elicitor caused a transient inflow of Ca^{2+} into cells could be observed in this experiment, thereby supporting the report that calcium ion plays an important role in the resistance reaction caused by the elicitor in cultured soybean cells. In the transformed cultured tobacco cells, about 10% transient increase in fluorescence intensity was observed 3 minutes after the addition of the elicitor, whereas no such change was observed after the addition of deionized water.

In the plasmid-containing cultured tobacco cells, none of the changes in fluorescence intensity that occurred in the transformed cultured tobacco cells was observed after the addition of the elicitor (Figure 5).

These results show that plants other than soybean (e.g., tobacco), which are not reactive with the glucan elicitor acquire the reactivity by introducing the gene of the soybean-derived glucan elicitor receptor for ER expression. Although the signal transduction pathway of each plant has not been completely explicated, it is expected that plants other than tobacco will acquire the reactivity with the glucan elicitor (i.e., a transient increase in intracellular Ca^{2+} con-

centration) by introducing the gene of the present ER for ER expression, thereby enabling the development of plants having resistance to a wide variety of fungi which use glucan as a mycelial wall component.

Example 4

Expression of Soybean ER in *E. coli* and Determination of Elicitor-binding Domain

1) Expression of Elicitor-binding Domain in *E. coli*

A fused protein of a partial fragment of the soybean ER with a maltose-binding protein (MBP) was prepared with a Protein Fusion & Purification System (New England Biolabs Co.) in order to express the partial fragment of the soybean ER in *E. coli*. PCR was performed using pER23-1 as a template to give DNA fragments of various lengths. The primers were designed to produce the MBP and fused protein in cloning into plasmid pMAL-c2 (New England Biolabs Co.) by adding a *Bam*HI site on the 5' side and a *Sall* site on the 3' side exterior to the DNA molecule encoding the full-length portion and fragments of soybean ER shown in Figure 6. These primers were synthesized with an automatic nucleic acid synthesizer (Model 394 of Applied Biosystems Co.). The following primers were used in the amplification of the DNA chain.

Primer U35 5'-ATGGATCCATGGTTAACATCCAAACC-3';
 Primer U36 5'-ATGGATCCGAATATACTGGGAGAAAG-3';
 Primer U37 5'-ATGGATCCCCAGCATGGGGTAGGAAG-3';
 Primer U38 5'-TAGTCGACTACTTCTCCAGTTATATTC-3';
 Primer U39 5'-TAGTCGACTACTTCTACCCCATGCTGG-3';
 Primer U40 5'-TAGTCGACTATTCTCACTTCTGCTATG-3';
 Primer U41 5'-ATGGATCCGCCCCACAAGGTCCCAAA-3'; and
 Primer U42 5'-ATGGATCCAATGACTCCAAGACCAAG-3'

The DNA molecule of pER23-1 (0.01 µg) was dissolved in 79 µl of distilled water. Either a combination of primers U5 and U7 or a combination of primers U10 and U12 (100 pmol each) and 0.5 µl of Taq DNA polymerase (TAKARA SHUZO CO., LTD.) were added to 8 µl of 2.5 mM dNTP in 10 µl of a 10 x PCR buffer (attached to Taq DNA polymerase of TAKARA SHUZO CO., LTD.) to give a final amount of 100 µl. PCR reaction was performed with a Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Co.) by 30 cycles of 1) denaturation at 94 °C x 30 seconds, 2) renaturation at 55°C x 30 seconds and 3) elongation at 72 °C x 1 minute. After the reaction, 15 µl of the reaction solution was digested with restriction enzymes *Bam*HI and *Sall* and electrophoresed on a 1% agarose gel.

The gel was stained with a 0.5 µg/ml ethidium bromide solution for 15 minutes. The band showing the expected specific amplification was sectioned while observing under UV light. The gel section was treated with Gene Clean II (Bio101 Co.) to collect a DNA-containing solution. The collected DNA fragments were cloned into the *Bam*HI-*Sall* site of plasmid pMAL-c2 and the clones were introduced into *E. coli* DH5α.

2) Preparation of Soluble Protein Fraction from *E. coli*

The *E. coli* cells into which the plasmids were introduced were precultured in an expression medium [10g/l tryptone (Gibco Co.), 5 g/l yeast extract (Gibco Co.), 5 g/l NaCl, 2 g/l glucose and 100 µg/ml ampicillin]. The precultured solution (0.4 ml) was added to 40 ml of the expression medium and cultured at 37 °C with shaking until OD₆₀₀ of 0.55 was reached. Isopropylthiogalactoside was added to the culture solution to give a final concentration of 0.3 mM and the shakeculture was continued for an additional 4 hours to induce expression. The *E. coli* was collected by centrifugation and the *E. coli* cells were washed with a washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl and 1 mM EDTA). The cells were sonicated for a total of 2 minutes (15 sec x 8). ZW3-12 was added to the sonicated cells to give a final concentration of 0.25% and the mixture was incubated at 4 °C for 30 minutes. The supernatant was collected by centrifugation (10,000 rpm, 5 minutes) to give an *E. coli* soluble protein fraction. The expression of the fused protein was confirmed by an immunoblotting technique using an anti-maltose-binding protein antibody (New England Biolabs Co.).

3) Elicitor-binding Experiment

The elicitor-binding activity was determined as follows:

A complex of an elicitor and tyramine (TOKYO KASEI KOGYO CO., LTD.) was synthesized by the method of Jong-Joo Cheong (The Plant Cell (1991) 3: 127). The elicitor-tyramine complex was labelled with iodine-125 using chloramine T. The resulting sample (protein amount < 800 µg) was suspended in 500 µl of an assay buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 0.1 M saccharose, 5 mM MgCl₂, 1mM PMSF and 5 mM EDTA) and incubated at 0°C for 2 hours. The iodine-

labelled elicitor-tyramine complex in an amount of 100 nM (70 Ci/mmol) was added to the suspension and the mixture was incubated at 4 °C for 2 hours. The reaction solution was filtered through Whatman GF/B (as treated with a 0.3% aqueous solution of polyethylenimine for at least 1 hour) and washed 3 times with 5 ml of an ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂). The radio activity retained on the filter membrane was counted with a gamma counter (count A). In order to eliminate the effect of non-specific binding, the same procedure as above was performed except that 17 µM of the elicitor was added to the same sample, the mixture was suspended in the assay buffer and the suspension was incubated at 0 °C for 2 hours. The obtained count was subtracted from the count A to give a count (Δ cpm) of elicitor-specific binding. The resulting count (Δ cpm) was divided by the total number of counts and then multiplied by the total amount of the elicitor used in the experiment to calculate the amount of the elicitor-binding protein (in moles).

As a result, a specific binding to the elicitor was observed in the *E. coli* transformed with the DNA molecule encoding the ER (Figure 6). Hence, it was reconfirmed that the obtained gene encoded a protein having the elicitor-binding activity and it was revealed that there was an elicitor-binding domain in the 239-442 amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

Example 5

Inhibition of Binding of Glucan Elicitor to Elicitor-binding Protein in Soybean Cotyledon Membrane Fraction and Inhibition of Accumulation of Phytoalexin in Soybean Cotyledon by Antibody against Elicitor-binding Domain

1) Expression of Elicitor-binding Domain in *E. coli*

A fused protein of an elicitor-binding domain derived from the ER with a maltose-binding protein (MBP) was prepared with a Protein Fusion & Purification System (New England Biolabs Co.) in order to express a large amount of the elicitor-binding domain in *E. coli*. PCR was performed to produce a DNA molecule encoding the elicitor-binding domain. The following primers were synthesized with an automatic nucleic acid synthesizer (Model 394 of Applied Biosystems Co.):

Primer U36 5'-ATGGATCCGAATATAACTGGGAGAAG-3'; and

Primer U39 5'-TAGTCGACTACTTCCTACCCCATGCTGG-3'

The DNA molecule of pER23-1 (0.01 µg) was dissolved in 79 µl of distilled water. Either a combination of primers U5 and U7 or a combination of primers U10 and U12 (100 pmol each) and 0.5 µl of Taq DNA polymerase (TAKARA SHUZO CO., LTD.) were added to 8 µl of 2.5 mM dNTP in 10 µl of a 10 x PCR buffer (attached to Taq DNA polymerase of TAKARA SHUZO CO., LTD.) to give a final amount of 100 µl. PCR was performed with a Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Co.) by 30 cycles of 1) denaturation at 94°C x 30 seconds, 2) renaturation at 55°C x 30 seconds and 3) elongation at 72 °C x 1 minute. After the reaction, 15 µl of the reaction solution was digested with restriction enzymes *Bam*HI and *Sal*I and electrophoresed on a 1% agarose gel.

The gel was stained with a 0.5 µg/ml ethidium bromide solution for 15 minutes. The band showing specific amplification was sectioned while observing under UV light. The gel section was treated with Gene Clean II (Bio101 Co.) to collect a DNA-containing solution. The collected DNA fragments were cloned into the *Bam*HI-*Sal*I site of plasmid pMAL-c2 and the clones were introduced into *E. coli* DH5α.

2) Purification of the Fused Protein Expressed in *E. coli* and Production of Antibody

The *E. coli* cells transformed with the plasmids were precultured in an expression medium (10g/l tryptone (Gibco Co.), 5 g/l yeast extract (Gibco Co.), 5 g/l NaCl, 2 g/l glucose and 100 µg/ml ampicillin) overnight. The precultured solution (150 ml) was added to 1.5 L of the expression medium and cultured in a Sakaguchi flask at 37°C with shaking until OD₆₀₀ of 0.55 was reached. Isopropylthiogalactoside was added to the culture solution to give a final concentration of 0.3 mM and the shakeculture was continued for an additional 4 hours to induce expression. The *E. coli* was collected by centrifugation and the *E. coli* cells were washed with a washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl and 1 mM EDTA). The cells were sonicated for a total of 2 minutes (15 sec x 8). A soluble protein fraction was obtained by centrifugation. From this fraction, a MBP-fused protein was purified with an amylose resin. A MBP- and an elicitor-binding domain were cleaved with factor Xa and the elicitor-binding domain was purified by gel filtration column chromatography. The purified protein was injected twice into a mouse at the abdominal cavity for immunization by the method of E. Harlow and D. Lane (Antibody (1988) Cold Spring Harbor Co., pp. 53-137). After the increase in titer was confirmed by an ELISA method, the ascites was obtained and subjected to precipitation with 50% saturated ammonium sulfate and treatment with Protein A Sepharose (Pharmacia Co.) to produce a purified antibody. In the treatment with Protein A Sepharose, the antibody was bound to Protein A Sepharose with 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) and eluted with

0.1 M citric acid (pH 3.5). It was confirmed by an immunoblotting that the obtained antibody recognized only the ER protein in soybean.

3) Preparation of Soybean Cotyledon Membrane Fraction

A soybean cytoledon membrane fraction was prepared as follows:

Soybean seeds were cultured on soil for 9 days and the cytoledons were harvested (36 g, wet weight). The cytoledons were suspended in 47 ml of an ice-cold buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.0, 30 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 2.5 mM sodium metabisulfite and 1 mM PMSF). A cytoledon membrane fraction was prepared by the same method as the one for preparing the membrane fraction from the soybean roots. The resulting cytoledon membrane fraction was suspended in 1 ml of an ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF and 5 mM EDTA) and stored at -80 °C.

4) Measurement of Inhibition of Glucan Elicitor Binding to Elicitor-binding Protein of Soybean Cotyledon Membrane Fraction

The elicitor-binding activity was determined as follows:

A complex of an elicitor and tyramine (TOKYO KASEI KOGYO CO., LTD.) was synthesized by the method of Jong-Joo Cheong (The Plant Cell (1991) 3: 127). The elicitor-tyramine complex was labelled with iodine-125 using chloramine T. The soybean cotyledon membrane fraction (100 µl, 820 µg) was suspended in 500 µl of an assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M saccharose, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF and 5 mM EDTA) and incubated at 0°C for 2 hours. The iodine-labelled elicitor-tyramine complex in an amount of 714 ng (143 nM; 70 Ci/mmol) was added to the suspension and the mixture was incubated at 4 °C for 2 hours. The reaction solution was filtered through Whatman GF/B (as treated with a 0.3% aqueous solution of polyethylenimine for at least 1 hour) and washed 3 times with 5 ml of an ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂). The radio activity retained on the filter membrane was counted with a gamma counter (count A). In order to eliminate the effect of non-specific binding, the same procedure as above was performed, except that 100 times mole (75 µg, 15 µM) of a cold elicitor was added to the sample, the mixture was suspended in the assay buffer and the suspension was incubated at 0°C for 2 hours. The obtained count was subtracted from the count A to give a count (Δ cpm) of elicitor-specific binding. Counts of binding obtained by adding 3.6, 7.1, 10.8, 14.4 and 28.8 µg of the purified antibody rather than the cold elicitor were subtracted from the count A. The resulting values were compared with that for the cold elicitor and expressed as the percentage, with the count (Δ cpm) of elicitor-specific binding being taken as 100% (Figure 7). The addition of 28.8 µg of the antibody resulted in the inhibition of the binding of elicitor by about 51%. The results confirmed that the antibody against the elicitor-binding domain inhibited the binding of the elicitor to the elicitor-binding protein.

5) Inhibition of Accumulation of Phytoalexin by Antibody against Elicitor-binding Domain

The amount of phytoalexin accumulated by the action of glucan elicitor was measured with soybean cotyledons by the method of M.G. Hahn et al. ((1992) Molecular Plant Pathology Volume II A Practical Approach, IRL Press, pp. 117-120).

A purified antibody against the elicitor-binding domain (0, 1, 2, 3, 4, 10 and 20 µg/25 µl/cotyledon) or a purified antibody against yeast-derived dsRNase, pac 1 (4, 10 and 20 µg/25 µl/cotyledon) as a control was added to soybean cotyledons and the mixture was incubated for 1 hour. Glucan elicitor (200 ng/25 µl/cotyledon) was added to the soybean cotyledons and the mixture was incubated for 20 hours to determine whether the accumulation of phytoalexin by the action of glucan elicitor was inhibited by the antibody. The amount of phytoalexin accumulation induced by the addition of elicitor subsequent to the addition of the antibody was expressed as the percentage, with the amount of phytoalexin accumulation by the sole addition of the elicitor being taken as 100% (Figure 8). When the antibody against the elicitor-binding domain was added in an amount of 20.0 µg per soybean cotyledon, the amount of phytoalexin accumulation decreased by about 53%. In the control, the amount of phytoalexin accumulation changed little even when the antibody against pac 1 was added in an amount of 20.0 µg per soybean cotyledon. These results showed that the obtained gene did not encode a mere elicitor-binding protein but encoded the ER inducing a resistance reaction in soybean.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

According to the present invention, a glucan elicitor receptor, DNA molecules coding for the glucan elicitor receptor and fragments thereof, vectors containing the DNA molecules or fragments thereof, and plant cells transformed with the DNA molecules or fragments thereof are provided.

The ER of the present invention is useful in the elucidation of resistance to fungi and the development of elicitor derivatives capable of inducing fungal resistance, and it can be used as an antigen for the production of antibodies against ERs.

5 The DNA molecules of the present invention which contain nucleotide sequences coding for the glucan elicitor receptor and fragments thereof are useful as materials for establishing techniques for developing fungi-resistant plants. In other words, the DNA molecules of the present invention and fragments thereof may be introduced and expressed in various plants to enhance their fungal resistance.

10 Antibodies against the glucan elicitor receptor of the present invention, the DNA molecules of the present invention which contain nucleotide sequences coding for the glucan elicitor receptor, their mutants and anti-sense DNAs can be used in the studies of the elicitor-binding site of ER and signal transduction.

Further, the information on the amino acid sequence of ER and the nucleotide sequence coding therefor can be used in the studies of the elicitor-binding site of ER and the signal transduction in which ER is involved.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Sequence Listing

INFORMATION FOR SEQ ID NO:1

LENGTH: 667 amino acids

TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: peptide

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Val Asn Ile Gln Thr Asn Thr Ser Tyr Ile Phe Pro Gln Thr Gln Ser Thr Val
 1 5 10 15
 Leu Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Ser Asn Leu Leu Ser Ser Pro Leu Pro
 20 25 30 35
 Thr Asn Ser Phe Phe Gln Asn Phe Val Leu Lys Asn Gly Asp Gln Gln Glu Tyr
 40 45 50
 Ile His Pro Tyr Leu Ile Lys Ser Ser Asn Ser Ser Leu Ser Leu Ser Tyr Pro
 55 60 65 70
 Ser Arg Gln Ala Ser Ser Ala Val Ile Phe Gln Val Phe Asn Pro Asp Leu Thr
 75 80 85 90
 Ile Ser Ala Pro Gln Gly Pro Lys Gln Gly Pro Pro Gly Lys His Leu Ile Ser
 95 100 105
 Ser Tyr Ser Asp Leu Ser Val Thr Leu Asp Phe Pro Ser Ser Asn Leu Ser Phe
 110 115 120 125
 Phe Leu Val Arg Gly Ser Pro Tyr Leu Thr Val Ser Val Thr Gln Pro Thr Pro
 130 135 140
 Leu Ser Ile Thr Thr Ile His Ser Ile Leu Ser Phe Ser Ser Asn Asp Ser Asn
 145 150 155 160
 Thr Lys Tyr Thr Phe Gln Phe Asn Asn Gly Gln Thr Trp Leu Leu Tyr Ala Thr
 165 170 175 180
 Ser Pro Ile Lys Leu Asn His Thr Leu Ser Glu Ile Thr Ser Asn Ala Phe Ser
 185 190 195

EP 0 727 488 A1

Gly Ile Ile Arg Ile Ala Leu Leu Pro Asp Ser Asp Ser Lys His Glu Ala Val
 200 205 210 215
 5 Leu Asp Lys Tyr Ser Ser Cys Tyr Pro Val Ser Gly Lys Ala Val Phe Arg Glu
 220 225 230
 10 Pro Phe Cys Val Glu Tyr Asn Trp Glu Lys Lys Asp Ser Gly Asp Leu Leu Leu
 235 240 245 250
 Leu Ala His Pro Leu His Val Gln Leu Leu Arg Asn Gly Asp Asn Asp Val Lys
 15 255 260 265 270
 Ile Leu Glu Asp Leu Lys Tyr Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val
 275 280 285
 20 Gly Asp Ser Trp Val Leu Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile
 290 295 300 305
 Lys Gly Ile Lys Glu Glu Ser His Asp Glu Ile Val Ser Ala Leu Ser Lys Asp
 25 310 315 320
 Val Glu Ser Leu Asp Ser Ser Ser Ile Thr Thr Thr Glu Ser Tyr Phe Tyr Gly
 325 330 335 340
 30 Lys Leu Ile Ala Arg Ala Ala Arg Leu Val Leu Ile Ala Glu Glu Leu Asn Tyr
 345 350 355 360
 Pro Asp Val Ile Pro Lys Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Thr Ile Glu Pro Trp
 35 365 370 375
 Leu Glu Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gly Phe Leu His Asp Glu Lys Trp Gly Gly
 380 385 390 395
 40 Ile Ile Thr Gln Lys Gly Ser Thr Asp Ala Gly Gly Asp Phe Gly Phe Gly Ile
 400 405 410
 45 Tyr Asn Asp His His Tyr His Leu Gly Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Ala Val Leu
 415 420 425 430
 Thr Lys Leu Asp Pro Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile
 50 435 440 445 450
 Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp Thr Lys Leu Asn Ser Asn Tyr Thr Arg Leu

55

EP 0 727 488 A1

	455	460	465
5	Arg Cys Phe Asp Pro Tyr Val Leu His Ser Trp Ala Gly Gly Leu Thr Glu Phe		
	470	475	480 485
	Thr Asp Gly Arg Asn Gln Glu Ser Thr Ser Glu Ala Val Ser Ala Tyr Tyr Ser		
10	490	495	500
	Ala Ala Leu Met Gly Leu Ala Tyr Gly Asp Ala Pro Leu Val Ala Leu Gly Ser		
	505	510	515 520
15	Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ile Glu Gly Thr Lys Met Trp Trp His Val Lys Glu		
	525	530	535 540
	Gly Gly Thr Leu Tyr Glu Lys Glu Phe Thr Gln Glu Asn Arg Val Met Gly Val		
20	545	550	555
	Leu Trp Ser Asn Lys Arg Asp Thr Gly Leu Trp Phe Ala Pro Ala Glu Trp Lys		
	560	565	570 575
25	Glu Cys Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Leu Ala Pro Ile Ser Glu Ala Ile		
	580	585	590
	Phe Ser Asn Val Asp Phe Val Lys Glu Leu Val Glu Trp Thr Leu Pro Ala Leu		
30	595	600	605 610
	Asp Arg Glu Gly Gly Val Gly Glu Gly Trp Lys Gly Phe Val Tyr Ala Leu Glu		
35	615	620	625 630
	Gly Val Tyr Asp Asn Glu Ser Ala Leu Gln Lys Ile Arg Asn Leu Lys Gly Phe		
	635	640	645
40	Asp Gly Gly Asn Ser Leu Thr Asn Leu Leu Trp Trp Ile His Ser Arg Ser Asp		
	650	655	660 665
	Glu		
45	667		

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2

LENGTH: 2004 base pairs

TYPE: nucleic acid

EP 0 727 488 A1

STRANDEDNESS: double

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE:

ORGANISM: Soybean (Glycine max L.)

STRAIN: Green Homer

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

9	18	27	36	45	54
GTT AAC ATC CAA ACC AAT ACA TCT TAC ATC TTC CCT CAA ACA CAA TCC ACT GTT					
Val Asn Ile Gln Thr Asn Thr Ser Tyr Ile Phe Pro Gln Thr Gln Ser Thr Val					
63	72	81	90	99	108
CTT CCT GAT CCC TCC AAA TTC TTC TCC TCA AAC CTT CTC TCA AGT CCA CTC CCC					
Leu Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Ser Asn Leu Leu Ser Ser Pro Leu Pro					
117	126	135	144	153	162
ACA AAC TCT TTC TTC CAA AAC TTT GTC CTA AAA AAT GGT GAC CAA CAA GAA TAC					
Thr Asn Ser Phe Phe Gln Asn Phe Val Leu Lys Asn Gly Asp Gln Gln Glu Tyr					
171	180	189	198	207	216
ATT CAT CCT TAC CTC ATC AAA TCC TCC AAC TCT TCC CTC TCT CTC TCA TAC CCT					
Ile His Pro Tyr Leu Ile Lys Ser Ser Asn Ser Ser Leu Ser Leu Ser Tyr Pro					
225	234	243	252	261	270
TCT CGC CAA GCC AGT TCA GCT GTC ATA TTC CAA GTC TTC AAT CCT GAT CTT ACC					
Ser Arg Gln Ala Ser Ser Ala Val Ile Phe Gln Val Phe Asn Pro Asp Leu Thr					
279	288	297	306	315	324
ATT TCA GCC CCA CAA GGT CCC AAA CAA GGT CCC CCT GGT AAA CAC CTT ATC TCC					

EP 0 727 488 A1

Ile Ser Ala Pro Gln Gly Pro Lys Gln Gly Pro Pro Gly Lys His Leu Ile Ser

5

333 342 351 360 369 378

TCC TAC AGT GAT CTC AGT GTC ACC TTG GAT TTC CCT TCT TCC AAT CTG AGC TTC

10

Ser Tyr Ser Asp Leu Ser Val Thr Leu Asp Phe Pro Ser Ser Asn Leu Ser Phe

387 396 405 414 423 432

15

TTC CTT GTT AGG GGA AGC CCC TAT TTG ACT GTG TCT GTG ACT CAA CCA ACT CCT

Phe Leu Val Arg Gly Ser Pro Tyr Leu Thr Val Ser Val Thr Gln Pro Thr Pro

20

441 450 459 468 477 486

CTT TCA ATT ACC ACC ATC CAT TCC ATT CTC TCA TTC TCT TCA AAT GAC TCC AAC

Leu Ser Ile Thr Thr Ile His Ser Ile Leu Ser Phe Ser Ser Asn Asp Ser Asn

25

495 504 513 522 531 540

ACC AAG TAC ACC TTT CAG TTC AAC AAT GGT CAA ACA TGG CTT CTT TAT GCT ACC

30

Thr Lys Tyr Thr Phe Gln Phe Asn Asn Gly Gln Thr Trp Leu Leu Tyr Ala Thr

549 558 567 576 585 594

35

TCC CCC ATC AAG TTG AAC CAC ACC CTT TCT GAG ATA ACT TCT AAT GCA TTT TCT

Ser Pro Ile Lys Leu Asn His Thr Leu Ser Glu Ile Thr Ser Asn Ala Phe Ser

40

603 612 621 630 639 648

GGC ATA ATC CGG ATA GCT TTG TTG CCG GAT TCG GAT TCG AAA CAC GAG GCT GTT

45

Gly Ile Ile Arg Ile Ala Leu Leu Pro Asp Ser Asp Ser Lys His Glu Ala Val

657 666 675 684 693 702

50

CTT GAC AAG TAT AGT TCT TGT TAC CCC GTG TCA GGT AAA GCT GTG TTC AGA GAA

Leu Asp Lys Tyr Ser Ser Cys Tyr Pro Val Ser Gly Lys Ala Val Phe Arg Glu

55

EP 0 727 488 A1

5 711 720 729 738 747 756
 CCT TTC TGT GTG GAA TAT AAC TGG GAG AAG AAA GAT TCA GGG GAT TTG CTA CTC
 Pro Phe Cys Val Glu Tyr Asn Trp Glu Lys Lys Asp Ser Gly Asp Leu Leu Leu

 10 765 774 783 792 801 810
 TTG GCT CAC CCT CTC CAT GTT CAG CTT CTT CGT AAT GGA GAC AAT GAT GTC AAA
 Leu Ala His Pro Leu His Val Gln Leu Leu Arg Asn Gly Asp Asn Asp Val Lys

 15 819 828 837 846 855 864
 ATT CTT GAA GAT TTA AAG TAT AAA AGC ATT GAT GGG GAT CTT GTT GGT GTT GTC
 Ile Leu Glu Asp Leu Lys Tyr Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val

 20 873 882 891 900 909 918
 GGG GAT TCA TGG GTT TTG AAA ACA GAT CCT TTG TTT GTA ACA TGG CAT TCA ATC
 Gly Asp Ser Trp Val Leu Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile

 25 927 936 945 954 963 972
 AAG GGA ATC AAA GAA GAA TCC CAT GAT GAG ATT GTC TCA GCC CTT TCT AAA GAT
 Lys Gly Ile Lys Glu Glu Ser His Asp Glu Ile Val Ser Ala Leu Ser Lys Asp

 30 981 990 999 1008 1017 1026
 GTT GAG AGC CTA GAT TCA TCA TCA ATA ACT ACA ACA GAG TCA TAT TTT TAT GGG
 Val Glu Ser Leu Asp Ser Ser Ser Ile Thr Thr Thr Glu Ser Tyr Phe Tyr Gly

 35 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 AAG TTG ATT GCA AGG GCT GCA AGG TTG GTA TTG ATT GCT GAG GAG TTG AAC TAC
 Lys Leu Ile Ala Arg Ala Ala Arg Leu Val Leu Ile Ala Glu Glu Leu Asn Tyr

 40
 45
 50
 55

EP 0 727 488 A1

5 1089 1098 1107 1116 1125 1134
CCT GAT GTG ATT CCA AAG GTT AGG AAT TTT TTG AAA GAA ACC ATT GAG CCA TGG
Pro Asp Val Ile Pro Lys Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Thr Ile Glu Pro Trp

10 1143 1152 1161 1170 1179 1188
TTG GAG GGA ACT TTT AGT GGG AAT GGA TTC CTA CAT GAT GAA AAA TGG GGT GGC
Leu Glu Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gly Phe Leu His Asp Glu Lys Trp Gly Gly

15 1197 1206 1215 1224 1233 1242
ATT ATT ACC CAA AAG GGG TCC ACT GAT GCT GGT GGT GAT TTT GGA TTT GGA ATT
Ile Ile Thr Gln Lys Gly Ser Thr Asp Ala Gly Gly Asp Phe Gly Phe Gly Ile

20 1251 1260 1269 1278 1287 1296
TAC AAT GAT CAC CAC TAT CAT TTG GGG TAC TTC ATT TAT GGA ATT GCG GTG CTC
Tyr Asn Asp His His Tyr His Leu Gly Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Ala Val Leu

25 1305 1314 1323 1332 1341 1350
ACT AAG CTT GAT CCA GCA TGG GGT AGG AAG TAC AAG CCT CAA GCC TAT TCA ATA
Thr Lys Leu Asp Pro Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile

30 1359 1368 1377 1386 1395 1404
GTG CAA GAC TTC TTG AAC TTG GAC ACA AAA TTA AAC TCC AAT TAC ACA CGT TTG
Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp Thr Lys Leu Asn Ser Asn Tyr Thr Arg Leu

35 1413 1422 1431 1440 1449 1458
AGG TGT TTT GAC CCT TAT GTG CTT CAC TCT TGG GCT GGA GGG TTA ACT GAG TTC
Arg Cys Phe Asp Pro Tyr Val Leu His Ser Trp Ala Gly Gly Leu Thr Glu Phe

40 1467 1476 1485 1494 1503 1512

45

50

55

EP 0 727 488 A1

5
ACA GAT GGA AGG AAT CAA GAG AGC ACA AGT GAG GCT GTG AGT GCA TAT TAT TCT
Thr Asp Gly Arg Asn Gln Glu Ser Thr Ser Glu Ala Val Ser Ala Tyr Tyr Ser

10
1521 1530 1539 1548 1557 1566
GCT GCT TTG ATG GGA TTA GCA TAT GGT GAT GCA CCT CTT GTT GCA CTT GGA TCA
Ala Ala Leu Met Gly Leu Ala Tyr Gly Asp Ala Pro Leu Val Ala Leu Gly Ser

15
1575 1584 1593 1602 1611 1620
ACA CTC ACA GCA TTG GAA ATT GAA GGG ACT AAA ATG TGG TGG CAT GTG AAA GAG
Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ile Glu Gly Thr Lys Met Trp Trp His Val Lys Glu

20
1629 1638 1647 1656 1665 1674
GGA GGT ACT TTG TAT GAG AAA GAG TTT ACA CAA GAG AAT AGG GTG ATG GGT GTT
25
Gly Gly Thr Leu Tyr Glu Lys Glu Phe Thr Gln Glu Asn Arg Val Met Gly Val

30
1683 1692 1701 1710 1719 1728
CTA TGG TCT AAC AAG AGG GAC ACT GGA CTT TGG TTT GCT CCT GCT GAG TGG AAA
Leu Trp Ser Asn Lys Arg Asp Thr Gly Leu Trp Phe Ala Pro Ala Glu Trp Lys

35
1737 1746 1755 1764 1773 1782
GAG TGT AGG CTT GGC ATT CAG CTC TTA CCA TTG GCT CCT ATT TCT GAA GCC ATT
40
Glu Cys Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Leu Ala Pro Ile Ser Glu Ala Ile

45
1791 1800 1809 1818 1827 1836
TTC TCC AAT GTT GAC TTT GTA AAG GAG CTT GTG GAG TGG ACT TTG CCT GCT TTG
Phe Ser Asn Val Asp Phe Val Lys Glu Leu Val Glu Trp Thr Leu Pro Ala Leu

50
1845 1854 1863 1872 1881 1890
GAT AGG GAG GGT GGT GTT GGT GAA GGA TGG AAG GGG TTT GTG TAT GCC CTT GAA

55

EP 0 727 488 A1

Asp Arg Glu Gly Gly Val Gly Glu Gly Trp Lys Gly Phe Val Tyr Ala Leu Glu

5

1899 1908 1917 1926 1935 1944

GGG GTT TAT GAC AAT GAA AGT GCA CTG CAG AAG ATA AGA AAC CTG AAA GGT TTT

10

Gly Val Tyr Asp Asn Glu Ser Ala Leu Gln Lys Ile Arg Asn Leu Lys Gly Phe

15

1953 1962 1971 1980 1989 1998

GAT GGT GGA AAC TCT TTG ACC AAT CTC TTG TGG TGG ATT CAT AGC AGA AGT GAT

Asp Gly Gly Asn Ser Leu Thr Asn Leu Leu Trp Trp Ile His Ser Arg Ser Asp

20

2004

GAA TAG

Glu

25

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3

LENGTH: 54 base pairs

30

TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

35

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: Other nucleic acid, synthetic DNA

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

40

GGAATTCGAG CTCGGTACCC GGGGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGGCA TGCA

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4

45

LENGTH: 58 base pairs

TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

50

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: Other nucleic acid, synthetic DNA

55

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

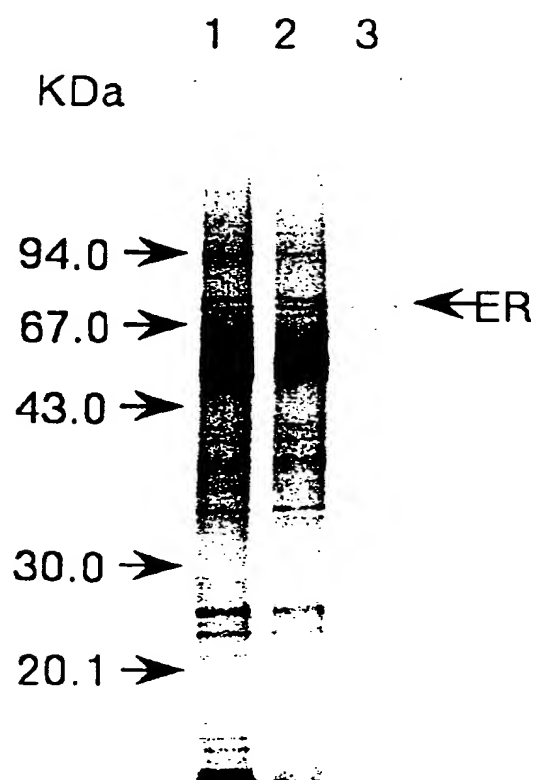
CCTTAAGCTC GAGCCATGGG CCCCCTAGGA GATCTCAGCT GGACGTCCGT ACGTTCGA

Claims

1. A glucan elicitor receptor having an amino acid sequence as substantially shown in SEQ ID NO:1.
2. A DNA molecule containing a nucleotide sequence coding for a glucan elicitor receptor having an amino acid sequence as substantially shown in SEQ ID NO:1, or fragments thereof.
3. The DNA molecule of claim 2, wherein the nucleotide sequence coding for a glucan elicitor receptor is as shown in SEQ ID NO:2, or fragments thereof.
4. A DNA molecule containing a nucleotide sequence coding for a glucan elicitor receptor, which is incorporated in plasmid pER23-1, or fragments thereof.
5. A vector containing the DNA molecule coding for a glucan elicitor receptor of any one of claims 2-4 or a fragment thereof.
6. A plant cell transformed with the DNA molecule coding for a glucan elicitor receptor of any one of claims 2-4 or a fragment thereof.

FIG. 1

SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS



1: Momo Q ACTIVE FRACTION

2: RUN-THROUGH FRACTION FROM MALTOSE-COUPLED GLASS GEL

3: ELUTED FRACTION FROM ELICITOR-COUPLED GLASS GEL

3: ELICITOR RECEPTOR

FIG. 2

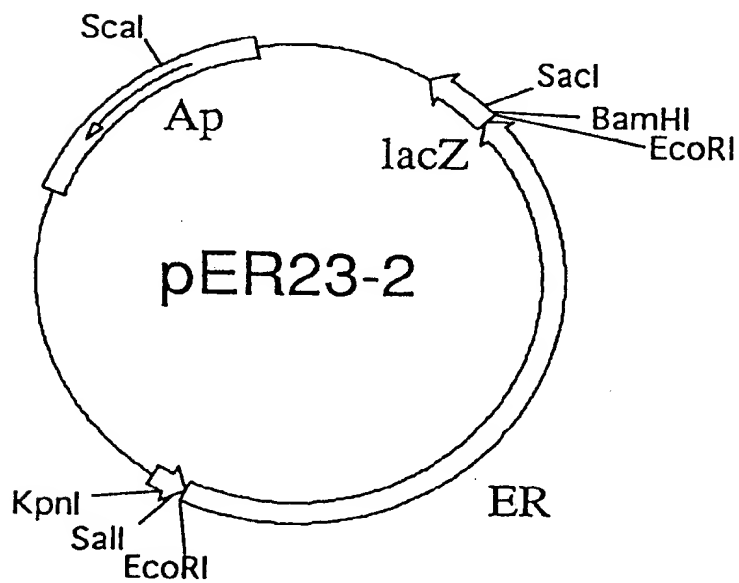
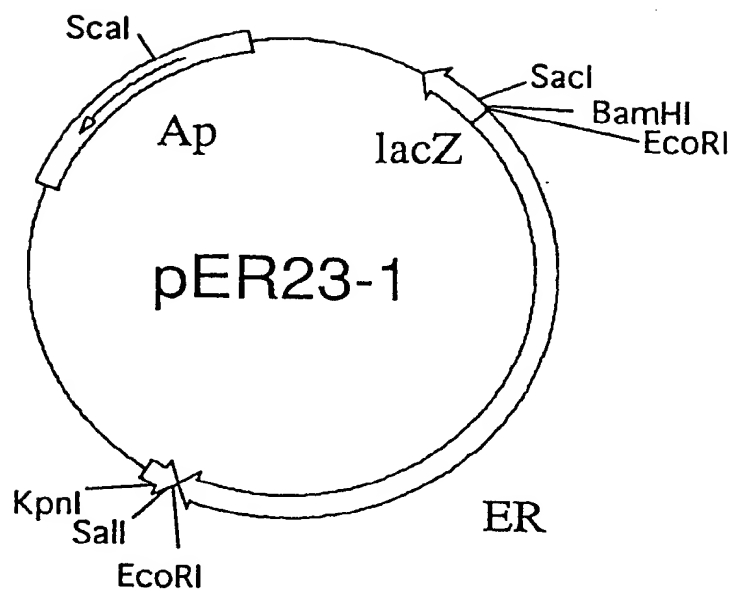


FIG. 3

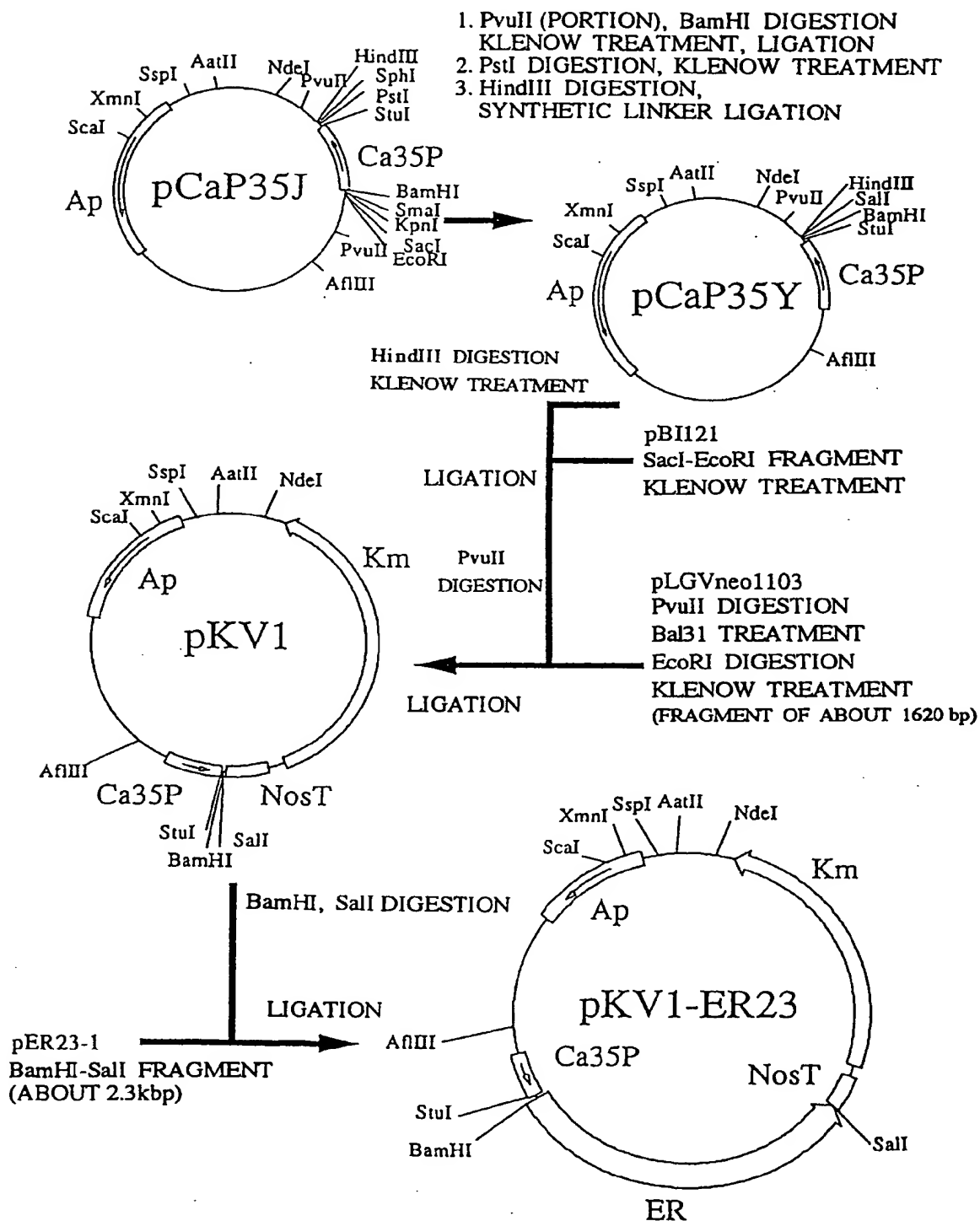
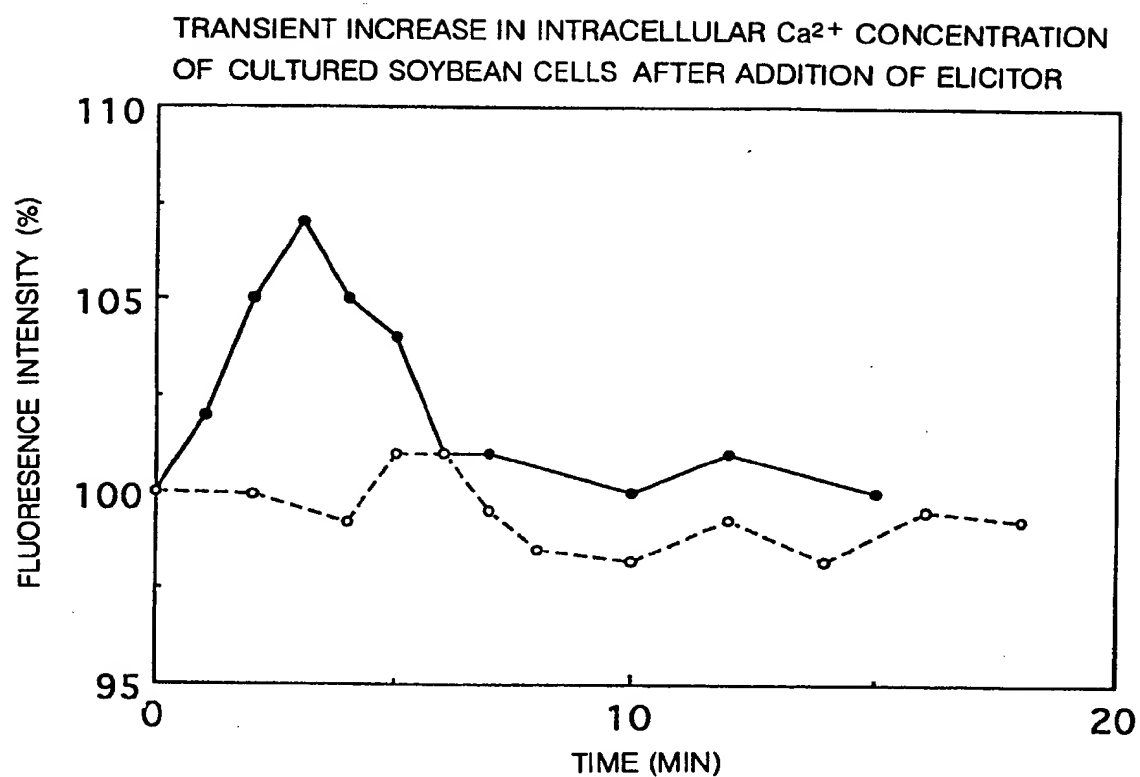


FIG. 4



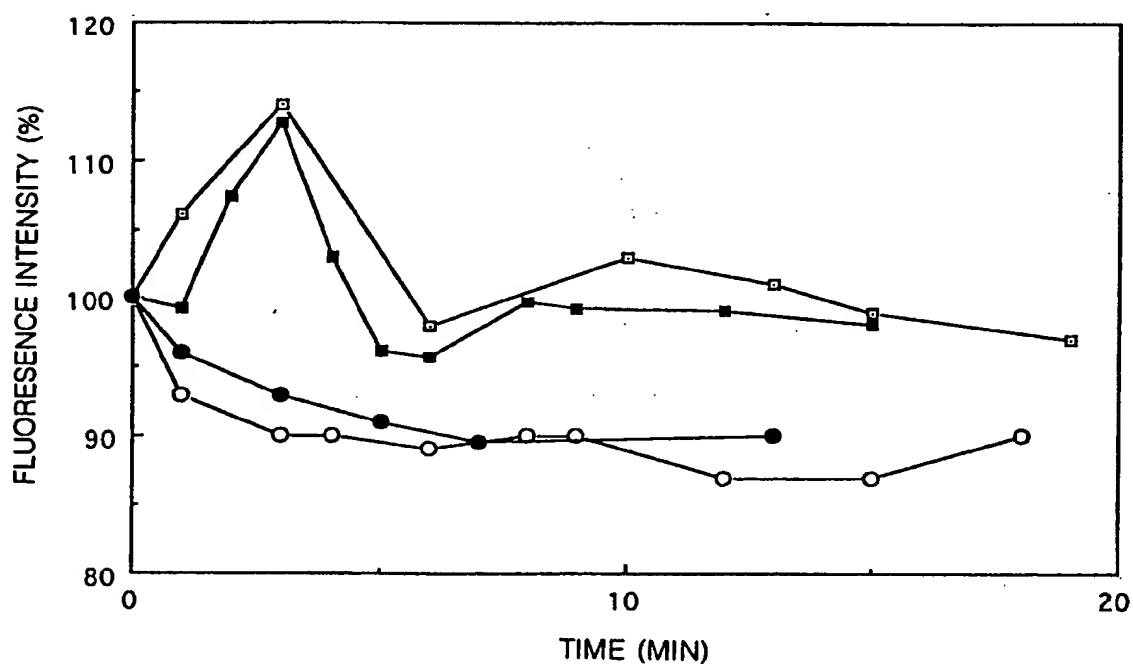
FLUORESCENCE INTENSITY (%) : FLUORESCENCE INTENSITY AFTER ADDITION OF SAMPLE/
FLUORESCENCE INTENSITY BEFORE ADDITION OF SAMPLE X 100

—●— : ELICITOR WAS ADDED TO CULTURED SOYBEAN CELLS.

---○--- : DEIONIZED WATER WAS ADDED TO CULTURED SOYBEAN CELLS.

FIG. 5

TRANSIENT INCREASE IN INTRACELLULAR Ca^{2+} CONCENTRATION OF TRANSFORMED CULTURED TOBACCO CELLS AFTER ADDITION OF ELICITOR



FLUORESCENCE
INTENSITY (%) :

FLUORESCENCE INTENSITY AFTER ADDITION OF SAMPLE/
FLUORESCENCE INTENSITY BEFORE ADDITION OF SAMPLE X 100

- : ELICITOR WAS ADDED TO TRANSFORMED CULTURED TOBACCO CELLS.
- : ELICITOR WAS ADDED TO TRANSFORMED CULTURED TOBACCO CELLS.
- : DEIONIZED WAS ADDED TO TRANSFORMED CULTURED TOBACCO CELLS.
- : ELICITOR WAS ADDED TO PLASMID-CONTAINING CULTURED TOBACCO CELLS.

FIG. 6

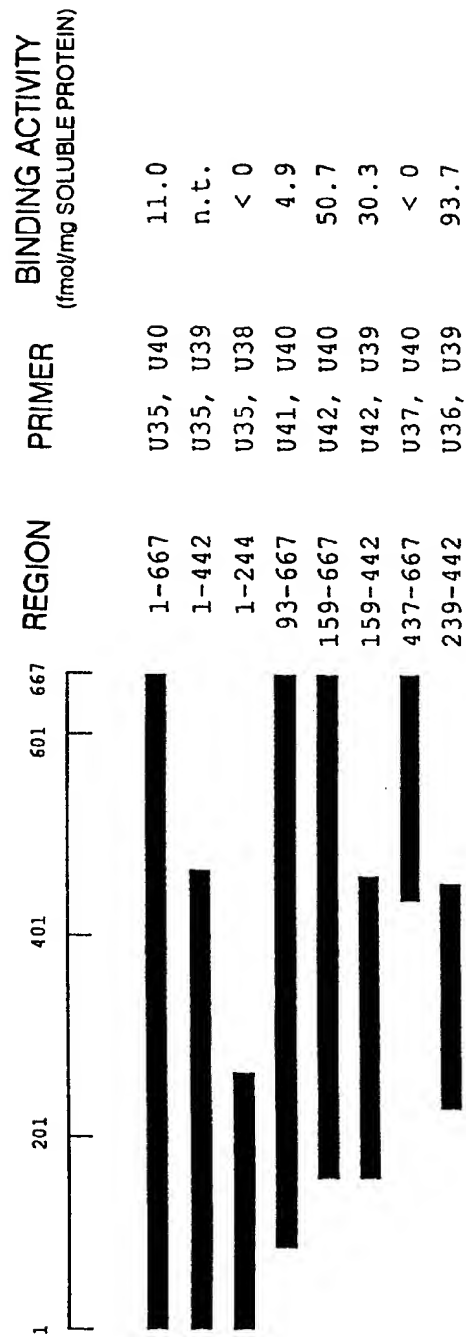


FIG. 7

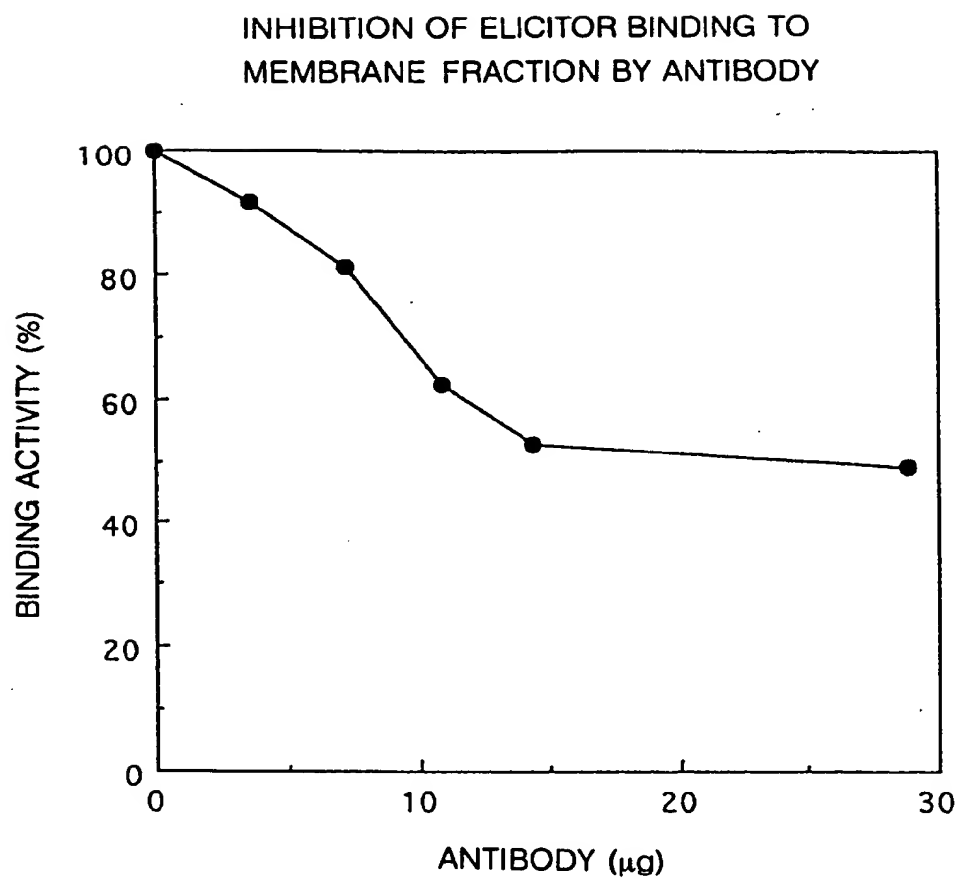
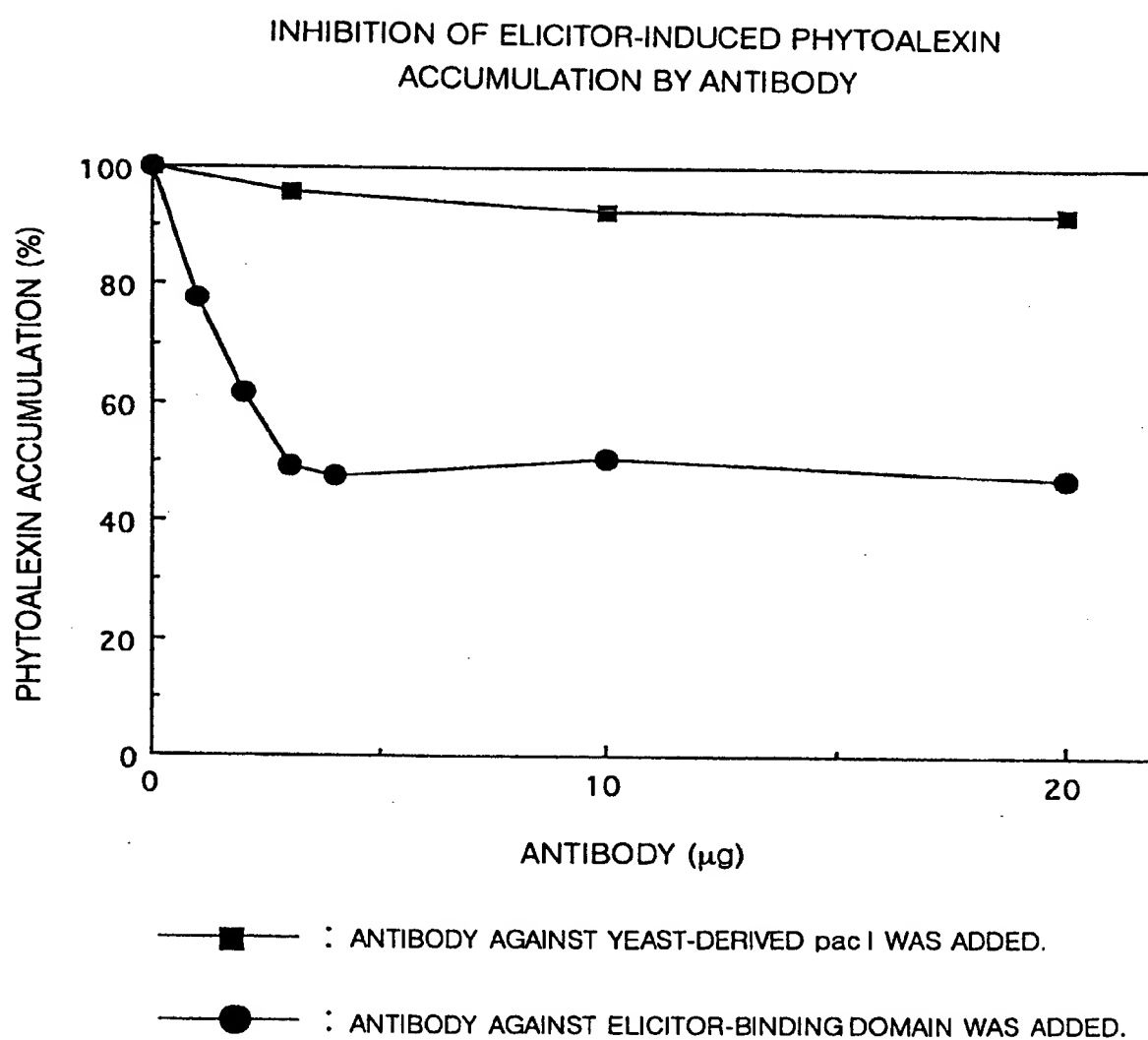


FIG. 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁶ C12N15/12, C07K14/705, C12N5/10 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl ⁶ C12N15/12, C07K14/705, C12N5/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP, 6-321995, A (Kirin Brewery Co., Ltd.), November 22, 1994 (22. 11. 94) (Family: none)	1 - 6
A	Frey, T. et al. "Affinity purification and characterization of a binding protein for a hepta-beta glucoside phytoalexin elicitor in soybean" Phytochemistry (1993) Vol. 32, No. 3, p. 543-550	1 - 6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search September 5, 1995 (05. 09. 95)		Date of mailing of the international search report September 26, 1995 (26. 09. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)